

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

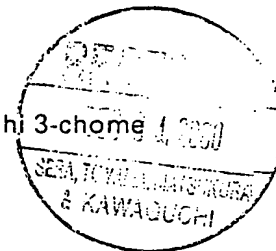
NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

TOYAMA, Tsutomu
Yokoyama Building
6th Floor
4-10, Higashi Nihonbashi 3-chome
Chuo-ku
Tokyo 103-0004
JAPON



Date of mailing (day/month/year) 20 November 2000 (20.11.00)	
Applicant's or agent's file reference B637SMOP1051	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/JP00/05973	International filing date (day/month/year) 01 September 2000 (01.09.00)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 03 September 1999 (03.09.99)
Applicant AJINOMOTO CO., INC. et al	

1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
3. An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
4. The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
03 Sept 1999 (03.09.99)	11/249545	JP	15 Nove 2000 (15.11.00)

The International Bureau of WIPO 34, ch min des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer Magda BOUACHA Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	--

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

WO 01/18184
PCT/JP00/05973

PCT

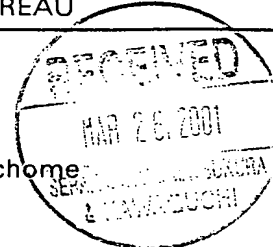
NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

TOYAMA, Tsutomu
Yokoyama Building
6th Floor
4-10, Higashi Nihonbashi 3-chome
Chuo-ku
Tokyo 103-0004
JAPON



Date of mailing (day/month/year) 15 March 2001 (15.03.01)		
Applicant's or agent's file reference B637SMOP1051		IMPORTANT NOTICE
International application No. PCT/JP00/05973	International filing date (day/month/year) 01 September 2000 (01.09.00)	Priority date (day/month/year) 03 September 1999 (03.09.99)
Applicant AJINOMOTO CO., INC. et al		

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:
AU,KP,KR,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

**AE,AG,AL,AM,AP,AT,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EA,EE,EP,ES,
 FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,KE,KG,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,
 MW,MX,MZ,NO,NZ,OA,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,**
 The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on
 15 March 2001 (15.03.01) under No. WO 01/18184

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a **demand for international preliminary examination** must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the **national phase**, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer <p style="text-align: center;">J. Zahra</p> Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	---

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05973

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N 9/12, C12N 15/54, C12N 1/21 // (C12N1/21, C12R 1:19)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12N 9/12, C12N 15/54, C12N 1/21

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE, GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, 96/37603, A (Ajinomoto Co. Inc.), 28 November, 1996 (28.11.96) & EP, 832970, A & US, 6010851, A & JP, 9-637603	1-27
A	EP, 857788, A (Ajinomoto Co. Inc.), 12 August, 1998 (12.08.98) & US, 6015697, A & JP, 10-201481	1-27

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
28 November, 2000 (28.11.00)

Date of mailing of the international search report
12 December, 2000 (12.12.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
〔PCT18条、PCT規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 B637SMOP1051	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/05973	国際出願日 (日.月.年) 01.09.00	優先日 (日.月.年) 03.09.99
出願人(氏名又は名称) 味の素株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 1 図とする。 ☒ 出願人が示したとおりである。

☐ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N 9/12, C12N 15/54, C12N 1/21 // (C12N1/21, C12R 1:19)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N 9/12, C12N 15/54, C12N 1/21

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE, GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO, 96/37603, A (Ajinomoto Co. Inc.) 28.11.1996 (28.11.96) & EP, 832970, A & US, 6010851, A & JP, 9-637603	1-27
A	EP, 857788, A (Ajinomoto Co. Inc.) 12.8.1998 (12.08.98) & US, 6015697, A & JP, 10-201481	1-27

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

28.11.00

国際調査報告の発送日

12.12.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

加藤 浩

印

4B

9050

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2001年3月15日 (15.03.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/18184 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 9/12,
15/54, 1/21 // (C12N 1/21, C12R 1:19)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/05973
- (22) 国際出願日: 2000年9月1日 (01.09.2000)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願平11/249545 1999年9月3日 (03.09.1999) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 味の素株式会社 (AJINOMOTO CO., INC.) [JP/JP]; 〒104-8315 東京都中央区京橋一丁目15番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 石川弘紀

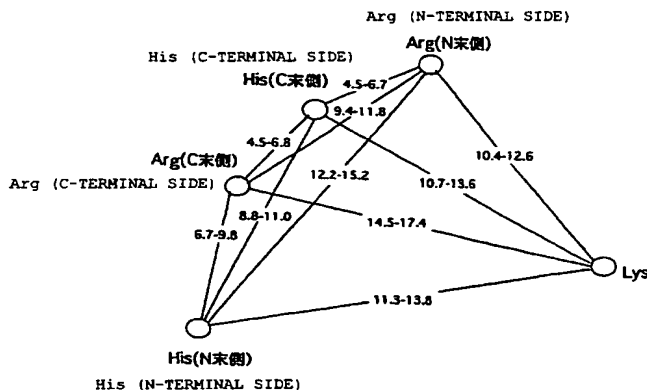
(ISHIKAWA, Kohki) [JP/JP]. 鈴木 榮一郎 (SUZUKI, Ei-ichiro) [JP/JP]. 権藤 慶子 (GONDOH, Keiko) [JP/JP]. 榛葉 信久 (SHIMBA, Nobuhisa) [JP/JP]; 〒210-8681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社 中央研究所内 Kanagawa (JP). 三原 康博 (MIHARA, Yasuhiro) [JP/JP]. 川崎 寿 (KAWASAKI, Hisashi) [JP/JP]. 倉橋 修 (KURAHASHI, Osamu) [JP/JP]. 幸田 徹 (KOUDA, Tohru) [JP/JP]. 島岡 恵 (SHI-MAOKA, Megumi) [JP/JP]. 小堤理絵 (KOZUTSUMI, Rie) [JP/JP]; 〒210-8681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社 発酵技術研究所内 Kanagawa (JP). 浅野泰久 (ASANO, Yasuhisa) [JP/JP]; 〒939-0362 富山県射水郡小杉町太閤山9-3-1-321 Toyama (JP).

- (74) 代理人: 遠山 勉, 外 (TOYAMA, Tsutomu et al.); 〒103-0004 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 ヨコヤマビル6階 Tokyo (JP).

[続葉有]

(54) Title: VARIANT NUCLEOSIDE-5'-PHOSPHATE PRODUCING ENZYME

(54) 発明の名称: 変異型ヌクレオシド-5' - リン酸生産酵素



(57) Abstract: A variant nucleoside-5'-phosphate producing enzyme having an elevated nucleoside-5'-phosphate productivity of an enzyme having a transphosphorylation activity and/or phosphatase activity. By identifying variations on the basis of X-ray structural analysis of known enzyme crystals, it is found out that the above enzyme has a structure wherein, in the nucleoside-5'-phosphate producing enzyme, a Lys residue, two Arg residues and two His residues are present, the Cα distances among these residues fall within a specific range, and there is a space allowing the attachment of nucleoside around these residues.

(57) 要約:

既知の酵素の結晶のX線構造解析に基づく変異の確定により、ヌクレオシド-5'-リン酸生産酵素において、Lys残基1つ、Arg残基2つ、His残基2つが存在し、これらのCα間距離が特定の範囲内にあり、かつその付近にヌクレオシドが結合するスペースを有する、リン酸基転移活性及び/又はホスファターゼ活性を有する酵素のヌクレオシド-5'-リン酸生産能が向上した変異型ヌクレオシド-5'-リン酸生産酵素を提供する。



(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

変異型ヌクレオシド-5'-リン酸生産酵素

技術分野

本発明は、ヌクレオシド-5'-リン酸生産能が向上した変異型ヌクレオシド-5'-リン酸生産酵素、及びその製造方法に関する。また、本発明は、上記した酵素の製造に有用な酵素類に関する。更に本発明は、ヌクレオシド-5'-リン酸の製造方法に関し、またその製造方法に有用な、前記の変異型酵素をコードする遺伝子、該遺伝子を含む組換えDNA、該組換えDNAを保有する微生物に関する。ヌクレオシド-5'-リン酸は、調味料、医薬並びにそれらの原料として有用である。なお、本発明は、X線結晶構造解析技術により蛋白質の新規立体構造の解明に成功したことに基づくと共に、該立体構造は微生物に限らない発展性を有する。

背景技術

ヌクレオシドを生化学的にリン酸化してヌクレオシド-5'-リン酸を安価かつ効率的に製造する方法として、特定の微生物菌体を、酸性条件下でヌクレオシド並びにポリリン酸（塩）、フェニルリン酸（塩）及びカルバミルリン酸から成る群より選択されるリン酸供与体に作用させることにより、ヌクレオシド-2'-リン酸、ヌクレオシド-3'-リン酸異性体の副生を伴うことなくヌクレオシド-5'-リン酸を効率よく生成する方法が開発されている（特開平7-231793号）。

その後、エシェリヒア・ブラッタエ（*Escherichia blattae*）及びモルガネラ・モルガニ（*Morganella morganii*）より酸性ホスファターゼをコードする遺伝子を取得し、遺伝子工学的に該遺伝子をエシェリヒア・コリで大量発現することによりヌクレオシド-5'-リン酸の生産性が更に向上することが確認された。

該酸性ホスファターゼの構造を図2に示す。すなわち、図2は、エシェリヒア・ブラッタエ由来酸性ホスファターゼ（以下、EB-APと略記する）のアミノ

酸配列を、モルガネラ・モルガニ、サルモネラ・チフィムリウム (*Salmonella typhimurium*)、ザイモモナス・モビリス (*Zymomonas mobilis*) 由来酸性ホスファターゼのアミノ酸配列とアラインメントした図である。星印は保存された残基を示す。2次構造の領域をアラインメントの上に棒で示した。四角の線で囲んだ部分は、酸性ホスファターゼファミリーの間で共通しているモチーフを示す。モチーフは、1) KXXXXXXRP (配列番号121)、2) PSGH (配列番号122)、3) SRXXXXHXXXD (配列番号123) の3つのドメインから成り立っている。ここで、Xは任意のアミノ酸である。

該酸性ホスファターゼ (図2) は、リン酸基転移活性を有するものの、野生型においては、ヌクレオシド-5' -リン酸をヌクレオシドに分解するホスファターゼ活性が優勢であり、蓄積されたヌクレオシド-5' -リン酸が分解されてしまう欠点があった。そこで、ランダムに多数の変異型酵素を発生させ、その中からホスファターゼ活性に比してリン酸基転移活性が相対的に向上した変異型酸性ホスファターゼが見出され、該変異型酸性ホスファターゼ遺伝子を大量発現させることによりヌクレオシド-5' -リン酸の生産性が飛躍的に向上することが示された (特開平8-535568号)。

該変異型酸性ホスファターゼは、ヌクレオシドに対する親和性が向上しており、それによりリン酸基転移活性が改善されたと考えられる。

上記のエシェリヒア・ブラッタエ由来変異型酸性ホスファターゼ (= G74D / I153T 変異型酵素 (74番目のGlyがAspに、かつ、153番目のIleがThrに置換した変異型酵素。以下、変異の様式は、同様に示す。)) は、モルガネラ・モルガニ由来酸性ホスファターゼ (MM-AP) の対応するG72D / I151T変異型酵素よりリン酸基転移活性が弱い、8つのアミノ酸残基を一次構造上対応するMM-APのアミノ酸に置換した10残基置換L63Q / A65Q / E66A / N69D / S71A / S72A / G74D / T135K / E136D / I153T変異型酵素 (以降、単に10残基置換変異型EB-APと記述) は、G72D / I151T変異型MM-APとほぼ同等のリン酸基転移活性を得ることが示された (特開平9-161674号)。

上述の生産性が向上したエシェリヒア・ブラッタエ由来酸性ホスファターゼ

(EB-A P) の G 7 4 D / I 1 5 3 T 変異型酵素遺伝子、更には 1 0 残基置換変異型酵素遺伝子をエシェリヒア・コリで大量発現することによりヌクレオシド-5'-リン酸を生産する方法が確立された(特開平 9-37785 号、特開平 10-201481 号)が、更に生産性の向上した変異型 EB-A P が望まれる。

発明の開示

本発明は、EB-A P の 3 次元構造に基づいて、変異型 EB-A P を設計することにより、ヌクレオシド-5'-リン酸生産性の更なる向上を図ることを課題とする。

本発明を概説すれば、下記に列挙するとおりである。

(1) ヌクレオシド-5'-リン酸生産酵素において、Lys 残基 1 つ、Arg 残基 2 つ、His 残基 2 つが存在し、これらの C α 間距離が図 1 に示す範囲内にあり、かつその付近にヌクレオシドが結合するスペースを有する、リン酸基転移活性及び/又はホスファターゼ活性を有する酵素を改変して得られる、ヌクレオシド-5'-リン酸生産能が向上した変異型ヌクレオシド-5'-リン酸生産酵素。

(2) 前記 Lys 残基、2 つの Arg 残基、及び 2 つの His 残基の C α 間距離が図 1 に示す範囲内にある (1) の変異型ヌクレオシド-5'-リン酸生産酵素。

(3) エシェリヒア・ブラッタエ由来酸性ホスファターゼの結晶を X 線結晶構造解析して得られる原子座標データに示されている構造座標を元にして、イノシン、グアノシン等のヌクレオシド並びにそのリン酸化合物との結合様式を推定し、アミノ酸残基及び/又は補欠因子等の置換、追加、削除によりヌクレオシド-5'-リン酸生産能が向上した (1) の変異型ヌクレオシド-5'-リン酸生産酵素。

(4) 酵素の由来がエシェリヒア属細菌、モルガネラ属細菌、プロビデンシア属細菌、エンテロバクター属細菌、又はクレブジエラ属細菌である (1) の変異型ヌクレオシド-5'-リン酸生産酵素。

(5) エシェリヒア・ブラッタエ由来酸性ホスファターゼのアミノ酸配列の以下の位置(エシェリヒア・ブラッタエ酸性ホスファターゼの Ser 72、又は Ser 72 から 10 Å 以内にある残基) : 16、67-76、78-79、96、99-

100、102-104、106-108、149-154、157、179、183の少なくとも一つの位置に変化が生じており、ヌクレオシド-5'-リン酸生産能が向上した変異型ヌクレオシド-5'-リン酸生産酵素。

(6) リン酸基転移活性及び／又はホスファターゼ活性を有する酵素であって、エシェリヒア・ブラッタエ由来酸性ホスファターゼとのアミノ酸配列アラインメントをしたときに、エシェリヒア・ブラッタエ由来酸性ホスファターゼのアミノ酸配列の以下の位置（エシェリヒア・ブラッタエ酸性ホスファターゼのSer72、又はSer72から10 Å以内にある残基）：16、67-76、78-79、96、99-100、102-104、106-108、149-154、157、179、183に対応する少なくとも一つの位置に変化が生じており、ヌクレオシド-5'-リン酸生産能が向上した変異型ヌクレオシド-5'-リン酸生産酵素。

(7) リン酸基転移活性及び／又はホスファターゼ活性を有する酵素であって、エシェリヒア・ブラッタエ由来酸性ホスファターゼの3次元構造とのアラインメントをトレッディング法により行ったときに、エシェリヒア・ブラッタエ由来酸性ホスファターゼのアミノ酸配列の以下の位置（エシェリヒア・ブラッタエ酸性ホスファターゼのSer72、又はSer72から10 Å以内にある残基）：16、67-76、78-79、96、99-100、102-104、106-108、149-154、157、179、183に対応する少なくとも一つの位置に変化が生じており、ヌクレオシド-5'-リン酸生産能が向上した変異型ヌクレオシド-5'-リン酸生産酵素。

(8) さらに、前記の位置（エシェリヒア・ブラッタエ酸性ホスファターゼのSer72、又はSer72から10 Å以内にある残基）以外の少なくとも一つの位置に変化を生じさせることによって、前記リン酸基転移活性及び／又はホスファターゼ活性を有する酵素の野生型よりもリン酸基転移活性が高い他種生物由来の酵素の立体構造に近づけた(6)の変異型ヌクレオシド-5'-リン酸生産酵素。

(9) エシェリヒア・ブラッタエ由来酸性ホスファターゼのアミノ酸配列の以下の位置：16、71、72、73、103、104、140、151、153の少なくとも一つの位置に変化が生じており、ヌクレオシド-5'-リン酸生産

能が向上した変異型ヌクレオシド-5'-リン酸生産酵素。

(10) リン酸基転移活性及び／又はホスファターゼ活性を有する酵素であって、エシェリヒア・ブラッタエ由来酸性ホスファターゼとのアミノ酸配列アライメントをしたときに、エシェリヒア・ブラッタエ由来酸性ホスファターゼのアミノ酸配列の以下の位置：16、71、72、73、103、104、140、151、153に対応する少なくとも一つの位置に変化が生じており、ヌクレオシド-5'-リン酸生産能が向上した変異型ヌクレオシド-5'-リン酸生産酵素。

(11) リン酸基転移活性及び／又はホスファターゼ活性を有する酵素であって、エシェリヒア・ブラッタエ由来酸性ホスファターゼとの3次元構造とのアライメントをトレディング法により行ったときに、エシェリヒア・ブラッタエ由来酸性ホスファターゼのアミノ酸配列の以下の位置：16、71、72、73、103、104、140、151、153に対応する少なくとも一つの位置に変化が生じており、ヌクレオシド-5'-リン酸生産能が向上した変異型ヌクレオシド-5'-リン酸生産酵素。

(12) エシェリヒア・ブラッタエ由来酸性ホスファターゼのアミノ酸配列の72番目の残基が、他のアミノ酸で置換された変異型ヌクレオシド-5'-リン酸生産酵素。

(13) リン酸基転移活性及び／又はホスファターゼ活性を有する酵素であって、エシェリヒア・ブラッタエ由来酸性ホスファターゼとのアミノ酸配列アライメントをしたときに、エシェリヒア・ブラッタエ由来酸性ホスファターゼのアミノ酸配列の72番目に対応する残基が他のアミノ酸で置換された変異型ヌクレオシド-5'-リン酸生産酵素。

(14) リン酸基転移活性及び／又はホスファターゼ活性を有する酵素であって、エシェリヒア・ブラッタエ由来酸性ホスファターゼの3次元構造とのアライメントをトレディング法により行ったときに、エシェリヒア・ブラッタエ由来酸性ホスファターゼのアミノ酸配列の72番目に対応する残基が、他のアミノ酸で置換された変異型ヌクレオシド-5'-リン酸生産酵素。

(15) 酵素の由来がエンテロバクター・アエロゲネス由来であり、そのアミ

ノ酸配列において 14 番目のロイシン残基、61 番目のロイシン残基、63 番目のアラニン残基、64 番目のグルタミン酸残基、67 番目のアスパラギン残基、69 番目のセリン残基、70 番目のアラニン残基、71 番目のグリシン残基、72 番目のグリシン残基、101 番目のイソロイシン残基、102 番目のグルタミン酸残基、133 番目のスレオニン残基、134 番目のグルタミン酸残基、138 番目のロイシン残基、149 番目のスレオニン残基、151 番目のイソロイシン残基のうち少なくとも一つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたものである(10)の変異型ヌクレオシド-5'-リン酸生産酵素。

(16) 酵素の由来がエンテロバクター・アエロゲネス由来であり、以下のいずれかのアミノ酸残基の置換を有する(12)の変異型ヌクレオシド-5'-リン酸生産酵素。

(a) 61 番目のロイシン残基がグルタミン残基に、63 番目のアラニン残基がグルタミン残基に、64 番目のグルタミン酸残基がアラニン残基に、67 番目のアスパラギン残基がアスパラギン酸残基に、69 番目のセリン残基がアラニン残基に、70 番目のアラニン残基がバリン残基に、72 番目のグリシン残基がアスパラギン酸残基に、102 番目のグルタミン酸残基がロイシン残基に、133 番目のスレオニン残基がリジン残基に、134 番目のグルタミン酸残基がアスパラギン酸残基に、149 番目のスレオニン残基がセリン残基に、151 番目のイソロイシン残基がセリン残基にそれぞれ置換する変異。

(b) 61 番目のロイシン残基がグルタミン残基に、63 番目のアラニン残基がグルタミン残基に、64 番目のグルタミン酸残基がアラニン残基に、67 番目のアスパラギン残基がアスパラギン酸残基に、69 番目のセリン残基がアラニン残基に、70 番目のアラニン残基がバリン残基に、72 番目のグリシン残基がアスパラギン酸残基に、133 番目のスレオニン残基がリジン残基に、134 番目のグルタミン酸残基がアスパラギン酸残基に、149 番目のスレオニン残基がアラニン残基に、151 番目のイソロイシン残基がセリン残基にそれぞれ置換する変異。

(c) 61 番目のロイシン残基がグルタミン残基に、63 番目のアラニン残基がグルタミン残基に、64 番目のグルタミン酸残基がアラニン残基に、67 番

目のアスパラギン残基がアスパラギン酸残基に、69番目のセリン残基がアラニン残基に、70番目のアラニン残基がグルタミン酸残基に、72番目のグリシン残基がアスパラギン酸残基に、133番目のスレオニン残基がリジン残基に、134番目のグルタミン酸残基がアスパラギン酸残基に、149番目のスレオニン残基がグリシン残基に、151番目のイソロイシン残基がセリン残基にそれぞれ置換する変異。

(d) 61番目のロイシン残基がグルタミン残基に、63番目のアラニン残基がグルタミン残基に、64番目のグルタミン酸残基がアラニン残基に、67番目のアスパラギン残基がアスパラギン酸残基に、69番目のセリン残基がアラニン残基に、70番目のアラニン残基がリジン残基に、72番目のグリシン残基がアスパラギン酸残基に、133番目のスレオニン残基がリジン残基に、134番目のグルタミン酸残基がアスパラギン酸残基に、149番目のスレオニン残基がグリシン残基に、151番目のイソロイシン残基がセリン残基にそれぞれ置換する変異。

(e) 61番目のロイシン残基がグルタミン残基に、63番目のアラニン残基がグルタミン残基に、64番目のグルタミン酸残基がアラニン残基に、67番目のアスパラギン残基がアスパラギン酸残基に、69番目のセリン残基がアラニン残基に、70番目のアラニン残基がメチオニン残基に、72番目のグリシン残基がアスパラギン酸残基に、102番目のグルタミン酸残基がグルタミン残基に、133番目のスレオニン残基がリジン残基に、134番目のグルタミン酸残基がアスパラギン酸残基に、149番目のスレオニン残基がセリン残基に、151番目のイソロイシン残基がセリン残基にそれぞれ置換する変異。

(17) リン酸基転移活性及び／又はホスファターゼ活性を有する酵素、あるいはそれとモリブデン酸との複合体の結晶をX線結晶構造解析して得られる立体構造から確定された、該酵素の活性部位、及び／又はそれから10 Å以内にあるアミノ酸残基を、置換、追加、削除をすることにより、ヌクレオシド-5'-リン酸生産能が向上した変異型酵素を製造することを特徴とする変異型ヌクレオシド-5'-リン酸生産酵素の製造方法。

(18) エシェリヒア・ブラッタエ由来酸性ホスファターゼの構造座標を使用

して、ホスファターゼ又はリン酸基転移酵素の阻害剤を製造する方法。

(19) リン酸基転移活性及び／又はホスファターゼ活性を有する酵素、あるいはそれとモリブデン酸との複合体のいずれかの結晶。

(20) 六方晶系の空間群 $P6_322$ を有する、エシェリヒア・ブラッタエ由来酸性ホスファターゼの結晶。

(21) 斜方晶系の空間群 $P2_12_12_1$ を有する、エシェリヒア・ブラッタエ由来酸性ホスファターゼ G74D / I153T 変異型酵素の結晶。

(22) 三方晶系の空間群 $P3_121$ を有する、エシェリヒア・ブラッタエ由来酸性ホスファターゼとモリブデン酸との複合体（反応中間体アナログ）の結晶。

(23) (1) ~ (16) のいずれかの酵素をコードする遺伝子。

(24) (23) に記載の遺伝子を含む組換え DNA。

(25) (23) の遺伝子又は (24) の組換え DNA が導入された微生物。

(26) (1) ~ (16) のいずれかの酵素、若しくはそれを含有する微生物、又は (25) に記載の微生物を、ヌクレオシド並びにリン酸供与体に作用させてヌクレオシド-5'-リン酸を生成させ、これを採取することを特徴とするヌクレオシド-5'-リン酸の製造方法。

(27) 前記酵素、若しくはそれを含有する微生物、又は (25) の微生物を、pH 3.0 ~ 5.5 の条件下でヌクレオシド並びにリン酸供与体に作用させることを特徴とする (26) の方法。

本発明は、EB-AP の 3 次元構造を基に、ヌクレオシドとの結合様式モデルを構築し、それに基づき設計した変異型 EB-AP を利用したヌクレオシド-5'-リン酸の生産方法を提供する。

但し、本発明の変異型ヌクレオシド-5'-リン酸生産酵素には、G74D / I153T 変異 EB-AP、G72D / I151T 変異 MM-AP、及び、10 残基置換変異型 EB-AP は含まれない。

以下、本発明を具体的に説明する。

(1) X線結晶構造解析により蛋白質の 3 次元構造を決定するには、蛋白質を結晶化する必要がある（実施例 1 ~ 3 に詳細を示した）。蛋白質を結晶化する

ためには、pH、バッファの種類、バッファの濃度、沈殿剤の種類、沈殿剤の濃度、金属等の添加剤の濃度、蛋白質の濃度、蛋白質の純度、等、数多くのパラメーターを試行錯誤により決定しなくてはならない。したがって、結晶を得るまでに数ヶ月～数年の時間がかかるのが通常であり、多大な労力に反して結晶が得られないケースも多々ある。結晶化は、3次元構造決定のためには欠かせないが、それ以外にも、蛋白質の高純度の精製法、高密度でプロテアーゼ抵抗性の強い安定な保存法、更には酵素の固定化利用に先立つプロセスとして産業上の有用性もある。

(2) 作製した結晶にX線を照射して回折データを収集する。蛋白質結晶はX線照射によりダメージを受け回折能が劣化するケースが多々ある。その場合、結晶を急激に -173°C 程度に冷却し、その状態で回折データを収集する低温測定が最近普及しつつある。なお、冷却に際しては、結晶が崩壊せず系全体がガラス状になるよう溶媒組成を工夫することが必要である。

(3) 結晶構造解析を行うには、回折データに加えて、位相情報が必要になる。

EB-APは、類縁の蛋白質の立体構造が未知であるため、重原子同型置換法により位相問題が解決されなくてはならない。重原子同型置換法は、水銀や白金等原子番号が大きな金属原子を結晶に導入し、金属原子の大きなX線散乱能のX線回折データへの寄与を利用して位相情報を得る方法である。野生型EB-APの立体構造が決定されれば、変異型酵素及び反応中間体アナログ等類縁体の結晶構造は、それを用いた分子置換法により決定できる。分子置換法は、結晶構造を決定したい蛋白質に類縁の蛋白質の立体構造が既知の場合、その立体構造を利用して構造決定を行う手法である。例えば、ある蛋白質の野生型の立体構造が分かっているならば、その変異型蛋白質や化学修飾された蛋白質の結晶構造決定には、分子置換法が適用できる。

G74D/I153T変異型EB-APについては、2ヶ所のアミノ酸置換によるヌクレオシド親和性向上の分子機構解明のために結晶構造を決定する。

反応中間体アナログについては、ヌクレオシドとの結合様式モデルを構築する

ために結晶構造を決定する。ヌクレオシドは、供与されるリン酸基が共有結合した状態のEB-AP、すなわち反応中間体に結合した後、ヌクレオシト-5'-リン酸に変換される。EB-APの反応中間体は不安定なので、その構造を捉えることができないが、リン酸の代りにモリブデン酸が共有結合した反応中間体アナログであれば加水分解されることがないので構造決定可能と考えた。実施例4、6、7に詳細を示した。

(4) コンピューターグラフィックス(CG)上で、反応中間体アナログの3次元構造におけるモリブデン酸結合位置を基に、その付近の窪みにヌクレオシドをフィットさせ、結合様式モデルを構築する(図3)。モデルの構築には、例えばMSI社(アメリカ)のQUANTA, INSIGHT IIの様なプログラムを利用する。

なお、図3は、上記の結合様式モデルの結晶構造を示す写真である。

実施例5、8に詳細を示した。

(5) 結合モデルを良く観察し、ヌクレオシドとの親和性を増大させる変異を設計する。親和性を向上させるには、疎水相互作用・静電相互作用・水素結合・ π - π 相互作用(芳香環の環電流が発生する磁場同士の相互作用)・CH/ π 相互作用(芳香環の環電流とメチル基の電子が発生する磁場の相互作用)を増強する手段が考えられる。

例えばEB-APでは、Ser72はヌクレオシドの塩基と最も強く相互作用すると予測されるため、Phe、Tyr、Trpへの置換は疎水性相互作用及び π - π 相互作用を、Val、Ile、Leuへの置換は疎水性相互作用及びCH/ π 相互作用を、Glu、Aspへの置換は静電相互作用及び水素結合を増強するものと思われる。また、他のアミノ酸への置換、特により長鎖の側鎖を有するアミノ酸への置換、によっても、疎水性相互作用等が増強される可能性がある。

Leu16、Ser71、Ser73、Glu104をPhe、Tyr、Trpに置換することによっても、置換されたアミノ酸残基の芳香環とヌクレオシドの塩基との間に π - π 相互作用が形成されることが期待される。また、Ile103やThr153をより長鎖の親水性残基に置換することにより、ヌクレオシドのリボースとの水素結合の形成が期待される。更に、ヌクレオシド結合部位の

近くに位置し、蛋白質内部に埋もれているThr151をSer, Ala、Glyといった小さな側鎖を持ったアミノ酸残基に置換すれば、蛋白質内部に空隙が生じるために、ヌクレオシド結合部位の柔軟性が増し、ヌクレオシドとの結合により適したコンフォメーションを取れるのではないかと期待される。なお、Leu140は、Ser72から10 Å以上離れているが、反応中間体アナログの立体構造において、リン酸結合部位の直近に位置する。したがって、この残基を置換すれば、反応中間体におけるリン酸結合部位周辺の構造が変化し、ひいては、ヌクレオシド結合部位の構造と揺らぎにも影響が及ぶものと考えられた。この残基を、よりかさ高いPhe、正電荷を有するLys、負電荷を有するGlu、に置換すれば、ヌクレオシドとの親和性が変化するのではないかと期待される。

上記の変異は、例えばG74D/I153T変異型EB-APに対して導入する。しかし、導入の対象とする変異型酵素は、G74D/I153T変異型EB-APに限られるものではない。例えば、10残基置換変異型EB-APに変異を導入することも可能である。

実施例10に詳細を示した。

(6) 変異型EB-APをコードする遺伝子を含むプラスミドを作製する。変異型EB-APをコードする遺伝子は、野生型EB-APをコードする遺伝子に、部位特異的変異法によって目的とする変異を導入することによって取得できる。

変異型EB-APをコードする遺伝子を含むプラスミドをエシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) JM109に導入し、変異型EB-APを生産させる。変異型EB-APのイノシンに対する親和性の指標になるKm値、及びイノシンを5'-イノシン酸に変換するリン酸基転移活性を測定し、変異型EB-APの性能を評価する。ヌクレオシド-5'-リン酸の生産量は、多分にKm値に依存すると考えられる。ピロリン酸がEB-APと反応し、リン酸イオンが離脱し、リン酸基がEB-APと共有結合した形の反応中間体が形成された後、水分子がこれを攻撃すれば、リン酸基が外れてしまう(ホスファターゼ反応)。ピロリン酸は、ヌクレオシド-5'-リン酸を生成せずに無駄に消費されたことになる。一方、

ヌクレオシドが反応中間体を攻撃すれば、リン酸基はヌクレオシドとホスホモノエステル結合を形成し、生成したヌクレオシド-5'-リン酸がEB-APから離脱する(リン酸基転移反応)。ピロリン酸はヌクレオシド-5'-リン酸生成に活用されたことになる。つまり、反応中間体を水とヌクレオシドが取り合い水が勝てばホスファターゼ活性が、ヌクレオシドが勝てばリン酸基転移活性が、発揮されることになる。ヌクレオシドのEB-APに対する親和性が上昇すれば、すなわち、Km値が低下すれば、リン酸基転移反応が行われる可能性が高くなる。また、リン酸結合部位付近の疎水性を高め、水が近づきにくくなれば、ホスファターゼ活性が弱まり、リン酸基転移活性が相対的に強まることになる。このように、本発明において「ヌクレオシド-5'-リン酸生産能が向上した」とは、変異型産生ホスファターゼのリン酸基転移活性が向上することであってもよく、ホスファターゼ活性が弱まること(W096/37603参照)であってもよく、また、その両方であってもよい。

実施例11に詳細を示した。

(7) Km値が低下し、かつリン酸基転移活性が上昇した変異型EB-AP遺伝子を含むプラスミドを導入したエシェリヒア・コリJM109を用いて、イノシンから5'-イノシン酸を生産する実験を行う。30℃で45時間反応を行い5'-イノシン酸生産量の経時変化をモニターする。実施例13に詳細を示した。

Kmを低下させる変異箇所が見いだされたら、複数の残基を組み合わせることによってさらにヌクレオシドに対する親和性が向上し、生産性の高くなった変異型酵素を作製することができる。累加的に部位特異的変異を繰り返すことで複数の変異部位を導入することができる。また部位特異的変異の導入の際に、変異を導入するアミノ酸残基をコードする塩基の部分がミックス塩基となったプライマーを用いると特定のアミノ酸残基がすべてのアミノ酸に置換された変異型遺伝子のライブラリーを作製することができる。複数の部位にミックス塩基のプライマーを用いて変異を導入すると非常に多種類の変異型酵素をコードする変異型遺伝子のライブラリーを作製することができる。このようにして構築した遺伝子のラ

ライブラリーをエシェリヒア・コリに導入し、発現させたライブラリーから高活性のアミノ酸置換が組み合わされた変異体を選び出す方法も有効である。

EB-A P 以外でも、EB-A P と同様の活性部位及びヌクレオシドが結合するスペースを持つ酵素であれば、ヌクレオシド-5' -リン酸の生産に利用できるポテンシャルがある。活性部位は、活性に必須なアミノ酸残基を有し、かつ、それらが適切な空間的位置関係で配置されていなくてはならない。EB-A P においては、Lys 1 1 5 , Arg 1 2 2 , His 1 5 0 , Arg 1 8 3 , His 1 8 9 が活性に必須であり、これら 5 残基の C α 間距離によって空間的位置関係を規定することが可能である。本発明においては、野生型、G 7 4 D / I 1 5 3 T 変異型、反応中間体アナログの 3 つの EB-A P 結晶構造を決定したので、それぞれの構造における活性残基の C α 原子間距離を測り、表 1 を作成した。表 1 の各々の距離分布が約 1 Å の幅を持つことから、最短距離より 1 Å 短い距離（表 1、下限）以上、最長距離より 1 Å 長い距離（表 1、上限）以下であれば、求められる活性部位を形成できるものと考えた。図 1 に、5 つの残基の位置関係を上限、下限の C α 間距離と共に示した。

なお、EB-A P の類縁酵素である MM-A P において、活性残基間のすべての原子間距離が、EB-A P の立体構造から規定した範囲におさまっていることが確認されたことを実施例 8 に示した。本実施例では、野生型ではなく、G 7 2 D / I 1 5 1 T 変異型の例を示したが、同じ酵素の野生型と変異型で、活性部位の立体構造に大きな違いはないと考えられる。この推測は、EB-A P の野生型と G 7 4 D / I 1 5 3 T 変異型の活性部位の構造が基本的に同じであることにより支持される（表 1 参照）。

表 1

		野生型	G74D/I153T 変異型	反応中間体 アナログ	下限	上限
Lys115	Arg122	11.6 Å	11.6 Å	11.4 Å	10.4 Å	12.6 Å
	His150	12.4 Å	12.3 Å	12.8 Å	11.3 Å	13.8 Å
	Arg183	16.4 Å	16.3 Å	15.5 Å	14.5 Å	17.4 Å
	His189	12.6 Å	12.1 Å	11.7 Å	10.7 Å	13.6 Å
Arg122	His150	13.2 Å	13.6 Å	14.2 Å	12.2 Å	15.2 Å
	Arg183	10.4 Å	10.5 Å	10.8 Å	9.4 Å	11.8 Å
	His189	5.6 Å	5.5 Å	5.7 Å	4.5 Å	6.7 Å
His150	Arg183	8.4 Å	8.8 Å	7.7 Å	6.7 Å	9.8 Å
	His189	9.8 Å	10.0 Å	10.0 Å	8.8 Å	11.0 Å
Arg183	His189	5.5 Å	5.8 Å	5.7 Å	4.5 Å	6.8 Å

ヌクレオシドをリン酸化して、ヌクレオシド-5'-リン酸に変換するには、上記の5残基から成る活性部位だけでは不十分で、ヌクレオシドが適切な位置に結合できなくてはならない。EB-APの場合は、リン酸基の結合部位付近に、ヌクレオシドが結合するのに適した溝状のスペースが分子表面に存在する〔(図3)：添付した原子座標を示す図10～図45を用いて、コンピュータグラフィックス(CG)上で表示できる。〕。この溝は、Leu16、Ser72、Glu104、His189の4残基によって囲まれるスペースとして規定される。活性部位を有していても、ヌクレオシドが結合する適切なスペースがない酵素は、ヌクレオシド-5'-リン酸生産酵素としては不適である。

本発明の変異型ヌクレオシド-5'-リン酸生産酵素は、Lys115、Arg122、His150、Arg183、His189の5残基のC α 間距離が図1に示す範囲内にあるリン酸基転移活性及び／又はホスファターゼ活性を有する酵素を改変することによって得ることができるものであるが、前記5残基付近にヌクレオシドが結合するスペースを有し、リン酸基転移活性を有する限り、前記5残基のC α 間距離は図1に示す範囲内になくてもよい。しかし、得られる変異型酸性ホスファターゼも、前記5残基のC α 間距離は図1に示す範囲内にあることが好ましい。

また、本発明は、Ser72の他のアミノ酸への置換、好ましくはPhe、Tyr、Trp、Val、Leu、Glu、Asp、Gln、Met、Thr、Ar

g、L y s のいずれか一つのアミノ酸への置換、を施した変異型 E B - A P、更に、それに加えて、ヌクレオシド-5' - リン酸生産能を向上させることが既に公表されている G 7 4 D と I 1 5 3 T の 2 変異を施した変異型 E B - A P (以降、3 残基置換変異型 E B - A P と記述) を提供する。更に、S e r 7 2 から 1 0 Å 以内にある残基 (残基番号: 1 6、7 0 - 7 1、7 3 - 7 6、1 0 0、1 0 2 - 1 0 4、1 0 6 - 1 0 8、1 1 5、1 4 8 - 1 5 4、1 8 3) はヌクレオシドと相互作用する可能性が非常に高く、これらアミノ酸残基の他のアミノ酸への置換を施した変異型 E B - A P を提供する。ここで置換とは、人為的にアミノ酸残基を置換した場合のみならず、自然界において置換が生じた E B - A P と同じ酵素ファミリーに属する他の酸性ホスファターゼを選抜することも包含する。ただし、本発明は、上記のアミノ酸残基以外の変異点を含む変異型 E B - A P も提供できるものとする。

また、E B - A P と同じ酵素ファミリーに属する他の酸性ホスファターゼにおいても、E B - A P におけるアミノ酸変異と相同のアミノ酸変異を施せば、ヌクレオシド-5' - リン酸の製造に利用することが可能である。そのような酸性ホスファターゼとしては、エシェリヒア・ブラッタエ以外のエシェリヒア属細菌、モルガネラ・モルガニ以外のモルガネラ属細菌、プロビデンシア・スチュアルティ (*Providencia stuartii*) 等のプロビデンシア属細菌、エンテロバクター属細菌、又はクレブシエラ・プランティコーラ (*Klebsiella planticola*) 等のクレブジエラ属細菌等に由来する酵素が挙げられる。ただし、E B - A P のアミノ酸残基が、他の酸性ホスファターゼにおいて同じ番号のアミノ酸残基に対応するとは限らない。例えば、E B - A P の S e r 7 2 は、M M - A P においては A l a 7 0 に対応する。2 つの異なった蛋白質のアミノ酸残基の対応付けは、両者のアミノ酸配列の相同性が 2 0 % 程度以上であればアミノ酸配列同士のアラインメント (Sequence Alignment)、2 0 % 程度以下であれば 3 次元構造とアミノ酸配列のアラインメント (Threading) により判明する。前者は BLAST 等、後者は INSIGHT II 等のプログラムにより実行が可能である。

BLAST を用いた、E B - A P と、エンテロバクター・アエロゲネス (*Enterobacter aerogenes*) 由来野生型酸性ホスファターゼ (野生型 E A - A P) のアミノ

酸配列アラインメントを実施例20に示した(図9参照)。尚、EB-A P、MM-A P、サルモネラ・チフィウム、サイモナス・モビリス由来酸性ホスファターゼのアミノ酸配列とのアラインメントは、図2に示したとおりである。EB-A P、MM-A P、サルモネラ・チフィウム、サイモナス・モビリス由来酸性ホスファターゼ、及びEA-A Pをコードする遺伝子及びこれらの酵素のアミノ酸配列を、配列番号1~10に示す。尚、これらの配列のうち、EA-A Pは10残基置換変異型であり、他は野生型である。また、EA-A Pはシグナルペプチドを含むプロタンパク質として示してある。その他、プロビデンシア・スチュアルティ (GenBank accession X64820) 及びクレブシエラ・ブランテイコーラ (GenBank accession E16588) 由来の酸性ホスファターゼのアミノ酸配列及びそれをコードする遺伝子の塩基配列は公知である。

酸性ホスファターゼが、シグナルペプチドを有する前駆体タンパク質として産生され、その後シグナルペプチドが除去されて成熟タンパク質にプロセスされる場合には、アラインメントは成熟タンパク質のアミノ酸配列に対して行う。

BLASTは、FTPを使って、ncbi.nlm.nih.govより/blast/executableに存在するファイルのうち、使用するコンピューターに則したファイル入手すればよい。

操作法については、http://genome.nhgri.nih.gov/blastall/blast_installに詳細が記述されている。

ヌクレオシド-5'-リン酸生産能向上は、ヌクレオシドとの親和性向上により達成されるケースが多いが、それ以外にも、反応速度の向上、至適pHのシフト、熱安定性の向上、等によっても達成されうる。至適pHのシフトは、活性残基のpKを変えることで達成できる(Protein Engng., 11, 383-388 (1998))。熱安定性の向上は、プロリン残基の導入、左巻きヘリックス構造を取る残基のグリシン残基への置換(Protein Engng., 6, 85-91 (1993))、蛋白質内部の空隙を埋めること(Biochemistry, 32, 6171-6178 (1993))等により達成可能である。

また、本発明の変異型ヌクレオシド-5'-リン酸生産酵素は、前記変異に加えて、ヌクレオシド-5'-リン酸生産能を害さない限り、他のアミノ酸残基の変異を有していてもよい。そのような変異としては、例えば、温度安定性が向上する変異が挙げられる(特開平10-201481号参照)。尚、単一の変異が、ヌクレ

オシド-5'-リン酸生産能の向上と、温度安定性の向上等、他の作用を示す場合があるが、いずれであっても、結果としてヌクレオシド-5'-リン酸生産能が向上していれば、本発明の変異型ヌクレオシド-5'-リン酸生産酵素に含まれる。

例えば、EB-APのSer72、又はSer72に相当するアミノ酸残基から10Å以内でない残基であっても、そのような残基を他の残基に置換することによって、ヌクレオシド-5'-リン酸生産能を向上させることができる。このようなアミノ酸残基としては、例えばEB-APでは、Leu140が、EA-APではLeu138が挙げられる。

以上詳細に説明したように、該立体構造はヌクレオシドの親和性が向上し、ヌクレオシド-5'-リン酸生産能の向上した変異体を作製するために有効であるが、該立体構造は酵素のヌクレオシドに対する親和性のみならず、リン酸供与体との親和性を変化させるのにも有効である。特開平9-37785に記載されているように該酵素はポリリン酸（塩）、フェニルリン酸（塩）、アセチルリン酸（塩）及びカルバミルリン酸（塩）等各種リン酸エステル化合物をリン酸供与体として利用することが可能であるが、ヌクレオシドとの親和性を増大させる変異を設計したのと同様の方法にて、リン酸エステル化合物との親和性を増大させる変異を設計することで、リン酸供与体の基質特異性を広げたり、リン酸の利用率を向上させることが可能である。

図面の簡単な説明

図1は、ホスファターゼ活性あるいはリン酸基転移活性を有する活性部位の構成要素となる5つのアミノ酸残基と、これらの空間的位置関係をC α 原子間の距離として示した図である。

図2は、EB-APのアミノ酸配列を、モルガネラ・モルガニ、サルモネラ・チフィウム、ザイモモナス・モビリス由来酸性ホスファターゼのアミノ酸配列とアラインメントした図である。

図3は、EB-AP反応中間体アナログとイノシンの結合様式モデルの結晶構

造を示すコンピューターグラフィックス (CG) の写真である。

図 4 は、EB-AP の 6 量体分子の結晶構造を示す CG の写真である。

図 5 は、EB-AP のサブユニットの結晶構造を示す CG の写真である。

図 6 は、EB-AP の活性部位構造を示す図である。

図 7 は、部位特異的突然変異誘発法に使用したプライマーセットを示す図である。

図 8 は、部位特異的突然変異誘発法に使用したプライマーセットを示す図である。

図 9 は、EB-AP とエンテロバクター・アエロゲネス由来野生型酸性ホスファターゼ (野生型 EA-AP) のアミノ酸配列アラインメントをプログラム BLAST により行った結果を示す図である。

図 10 は、EB-AP の構造の結晶学データ (1) を示す図である。

図 11 は、EB-AP の構造の結晶学データ (2) を示す図である。

図 12 は、EB-AP の構造の結晶学データ (3) を示す図である。

図 13 は、EB-AP の構造の結晶学データ (4) を示す図である。

図 14 は、EB-AP の構造の結晶学データ (5) を示す図である。

図 15 は、EB-AP の構造の結晶学データ (6) を示す図である。

図 16 は、EB-AP の構造の結晶学データ (7) を示す図である。

図 17 は、EB-AP の構造の結晶学データ (8) を示す図である。

図 18 は、EB-AP の構造の結晶学データ (9) を示す図である。

図 19 は、EB-AP の構造の結晶学データ (10) を示す図である。

図 20 は、EB-AP の構造の結晶学データ (11) を示す図である。

図 21 は、EB-AP の構造の結晶学データ (12) を示す図である。

図 22 は、EB-AP の構造の結晶学データ (13) を示す図である。

図 23 は、EB-AP の構造の結晶学データ (14) を示す図である。

図 24 は、EB-AP の構造の結晶学データ (15) を示す図である。

図 25 は、EB-AP の構造の結晶学データ (16) を示す図である。

図 26 は、EB-AP の構造の結晶学データ (17) を示す図である。

図 27 は、EB-AP の構造の結晶学データ (18) を示す図である。

図 28 は、EB-AP の構造の結晶学データ (19) を示す図である。
図 29 は、EB-AP の構造の結晶学データ (20) を示す図である。
図 30 は、EB-AP の構造の結晶学データ (21) を示す図である。
図 31 は、EB-AP の構造の結晶学データ (22) を示す図である。
図 32 は、EB-AP の構造の結晶学データ (23) を示す図である。
図 33 は、EB-AP の構造の結晶学データ (24) を示す図である。
図 34 は、EB-AP の構造の結晶学データ (25) を示す図である。
図 35 は、EB-AP の構造の結晶学データ (26) を示す図である。
図 36 は、EB-AP の構造の結晶学データ (27) を示す図である。
図 37 は、EB-AP の構造の結晶学データ (28) を示す図である。
図 38 は、EB-AP の構造の結晶学データ (29) を示す図である。
図 39 は、EB-AP の構造の結晶学データ (30) を示す図である。
図 40 は、EB-AP の構造の結晶学データ (31) を示す図である。
図 41 は、EB-AP の構造の結晶学データ (32) を示す図である。
図 42 は、EB-AP の構造の結晶学データ (33) を示す図である。
図 43 は、EB-AP の構造の結晶学データ (34) を示す図である。
図 44 は、EB-AP の構造の結晶学データ (35) を示す図である。
図 45 は、EB-AP の構造の結晶学データ (36) を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例により更に具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されない。

実施例 1 野生型 EB-AP の結晶化

ハンギングドロップ法での蒸気拡散を利用して結晶化を行った。野生型 EB-AP (濃度 10 mg/ml) を含むリン酸ナトリウムの 20 mM 緩衝液 (pH 8.0) と、45 (w/v%) のポリエチレングリコール 400 を含むトリス塩酸の 100 mM 緩衝液を同量ずつ (各々 7~10 μ l)、シリコナイゼーションしたカバーガラス上に滴下混合し、45 (w/v%) のポリエチレングリコール 40

0を含むトリス塩酸の100 mM緩衝液500 μ lを満たしたウエル (well) の上に混合液滴が釣り下がるようにかぶせ、20 $^{\circ}$ Cにて静置した。2、3日後に結晶が析出し、1週間から2週間後には測定可能な大きさ(0.3 \times 0.3 \times 1.2 mm程度)の六角柱状の結晶に成長した。X線データ測定の際には、50 (w/v%)のポリエチレングリコール400を含むトリス塩酸の100 mM緩衝液(pH 8.0)に結晶を移した。

この結晶は、取扱い上、次の点に留意する必要があった。1) 液滴(ドロップレット)から、結晶を取り出す際に容器や用具に接触することで結晶が非常に崩れやすいため、シッティングドロップ法の結晶化形態は用いることが出来ず(結晶は成長するが)、ここで述べたハンギングドロップ法を用いた。2) 常温測定では、測定中に結晶が劣化し、徐々に分解能が下がるため、低温条件下での測定が必要であった。結晶をステージにマウントするまでの時間を極力短くし、空気にさらさないように工夫した。

(株)リガクのX線回折装置R-Axis IIcを用いて、X線回折データを収集し、結晶学的パラメーターを決定した。空間群はP6₃22、格子定数は、a = b = 124.4 Å、c = 97.7 Åとなった。非対称単位に分子量25000のサブユニットを一つ含むと仮定すると、結晶の水分含有率は72%となる。

実施例2 G74D/I153T変異型EB-APの結晶化

ハンギングドロップ法での蒸気拡散を利用して結晶化を行った。G74D/I153T変異型酵素(濃度20 mg/ml)を含むトリス塩酸の20 mM緩衝液(pH 8.0)と、38 (w/v%)のポリエチレングリコール400を含むトリス塩酸の20 mM緩衝液を同量ずつ(各々5 μ l)、シリコナイゼーションしたカバーガラス上に滴下混合し、38 (w/v%)のポリエチレングリコール400を含むトリス塩酸の20 mM緩衝液500 μ lを満たしたウエルの上に混合液滴が釣り下がるようにかぶせ、20 $^{\circ}$ Cにて静置した。2、3日後に結晶が析出し、1週間後には測定可能な大きさ(0.7 \times 0.4 \times 0.2 mm程度)の板状結晶に成長した。X線データ測定の際には、50 (w/v%)のポリエチレングリコール400を含むトリス塩酸の100 mM緩衝液(pH 8.0)に結晶を移した。

(株)リガクのX線回折装置R-AXIS IIcを用いて、X線回折データを収集し、結晶学的パラメーターを決定した。空間群は $P2_12_12_1$ 、格子定数は $a = 138.0 \text{ \AA}$ 、 $b = 168.3 \text{ \AA}$ 、 $c = 58.2 \text{ \AA}$ となった。非対称単位に分子量150000の6量体分子を一つ含むと仮定すると、結晶の水分含有率は64%となる。

実施例3 野生型EB-APとモリブデン酸との複合体（反応中間体アナログ）の結晶化

シッティングドロップ法での蒸気拡散を利用した共結晶化法を用いて結晶化を行った。野生型EB-AP（濃度10mg/ml）を含むリン酸ナトリウムの20mM緩衝液(pH8.0)と、40(w/v%)のポリエチレングリコール400、及び1mMのモリブデン酸ナトリウムを含むトリス塩酸の100mM緩衝液を同量ずつ（各々15 μ l）を、40(w/v%)のポリエチレングリコール400を含むトリス塩酸の100mM緩衝液(pH8.0)500 μ lを満たしたウェルに設置したブリッジの窪みに滴下混合し、20℃にて静置した。2～3日後に結晶が析出し、1週間から2週間後には測定可能な大きさ（0.3×0.3×0.3mm程度）の菱餅状の結晶に成長した。X線データ測定の際には、50(w/v%)のポリエチレングリコール400を含むトリス塩酸の100mM緩衝液(pH8.0)に結晶を移した。

(株)リガクのX線回折装置R-AXIS IIcを用いて、X線回折データを収集し、結晶学的パラメーターを決定した。空間群は $P3_121$ 、格子定数は $a = b = 86.6 \text{ \AA}$ 、 $c = 205.3 \text{ \AA}$ となった。非対称単位に分子量25000のサブユニットを3つ含むと仮定すると、結晶の水分含有率は58%となる。

実施例4 野生型EB-APの結晶構造解析

最高1.9 \AA 分解能データまでのX線回折データを測定した。結晶は、常温においては、X線の照射によるダメージが激しかったので、-173℃に急速冷却して測定を行った。重金属塩類の溶液中に結晶を浸すことにより、重原子誘導体のスクリーニングを行った。重原子誘導体結晶の回折データはリガクR-AXIS IIcを用いて得た。ネイティブデータとの差フーリエ図より、 K_2PtCl_4 が良好な

重原子同型結晶を与えることを見出した。プログラムRSPSを用いることにより、 K_2PtCl_4 の唯一のプラチナ結合部位の座標を求めた。この座標をプログラムMLPHAREにより精密化し、それから計算される位相を求めた。この位相を用い、2つ目の重原子誘導体 $KHgI_4-KI$ の5カ所の水銀結合部位を求めた。 K_2PtCl_4 、 $KHgI_4-KI$ 両方の重原子パラメーターをMLPHAREを用いて同時に精密化した後、プログラムDMを用いて、溶媒平滑化とヒストグラムマッチングを行い、位相を改良した。ちなみに、 K_2PtCl_4 については異常分散データも使用した。この良好な位相を用いて計算した電子密度マップは非常に鮮明で、ほとんどのアミノ酸残基をきれいにフィットすることができた。

最初のモデルは、2.8 Å分解能で作成した電子密度マップ上でプログラムQUANTAを用いて構築し、プログラムX-PLORを用いて構造精密化を行った。N末の6残基、135-136番目の残基、C末の1残基は電子密度が観測されず、構造を一義的に決定できなかった。1.9 Å分解能で精密化された最終モデル(図4～図6)は、全231残基中222残基、236個の水分子、1分子の硫酸イオンを含む。硫酸イオンは、精製過程で用いた硫酸アンモニウムに由来しており、活性中心のリン酸結合部位に一致するものと考えられる。8～1.9 Å分解能の反射を用いた結晶学的信頼度因子(R因子)は21.5%となった。平均の温度因子は、蛋白質原子について 2.6 \AA^2 、水分子について 4.5 \AA^2 となった。プログラムPROCHECKを用いてラマチャンドラプロットを作成したところ、グリシン以外の残基の93%が最も好ましい領域に、7%が次に好ましい領域に位置することが示された。非対称単位にはサブユニット1個が含まれ、結晶学的対称性によって6量体が形成される。原子座標は図10～図45に示した。

なお、図4は、EB-APの6量体分子の結晶構造を示すCG写真である。 α 炭素原子の流れをリボンモデルで表示した。また、活性中心をマークする硫酸イオンをボールモデルで表示した。

図5は、EB-APのサブユニットの結晶構造を示すCG写真である。 α 炭素原子の流れをリボンモデルで表示した。また、活性中心をマークする硫酸イオンをボールモデルで表示した。

図6は、EB-APの活性部位構造を示す図である。中央に硫酸イオンを示し

た。また、水素結合を点線で示した。

図10は、EB-APの構造の結晶学データ(1)を示す図である。

図11は、EB-APの構造の結晶学データ(2)を示す図である。

図12は、EB-APの構造の結晶学データ(3)を示す図である。

図13は、EB-APの構造の結晶学データ(4)を示す図である。

図14は、EB-APの構造の結晶学データ(5)を示す図である。

図15は、EB-APの構造の結晶学データ(6)を示す図である。

図16は、EB-APの構造の結晶学データ(7)を示す図である。

図17は、EB-APの構造の結晶学データ(8)を示す図である。

図18は、EB-APの構造の結晶学データ(9)を示す図である。

図19は、EB-APの構造の結晶学データ(10)を示す図である。

図20は、EB-APの構造の結晶学データ(11)を示す図である。

図21は、EB-APの構造の結晶学データ(12)を示す図である。

図22は、EB-APの構造の結晶学データ(13)を示す図である。

図23は、EB-APの構造の結晶学データ(14)を示す図である。

図24は、EB-APの構造の結晶学データ(15)を示す図である。

図25は、EB-APの構造の結晶学データ(16)を示す図である。

図26は、EB-APの構造の結晶学データ(17)を示す図である。

図27は、EB-APの構造の結晶学データ(18)を示す図である。

図28は、EB-APの構造の結晶学データ(19)を示す図である。

図29は、EB-APの構造の結晶学データ(20)を示す図である。

図30は、EB-APの構造の結晶学データ(21)を示す図である。

図31は、EB-APの構造の結晶学データ(22)を示す図である。

図32は、EB-APの構造の結晶学データ(23)を示す図である。

図33は、EB-APの構造の結晶学データ(24)を示す図である。

図34は、EB-APの構造の結晶学データ(25)を示す図である。

図35は、EB-APの構造の結晶学データ(26)を示す図である。

図36は、EB-APの構造の結晶学データ(27)を示す図である。

図37は、EB-APの構造の結晶学データ(28)を示す図である。

図38は、EB-APの構造の結晶学データ(29)を示す図である。

図39は、EB-APの構造の結晶学データ(30)を示す図である。

図40は、EB-APの構造の結晶学データ(31)を示す図である。

図41は、EB-APの構造の結晶学データ(32)を示す図である。

図42は、EB-APの構造の結晶学データ(33)を示す図である。

図43は、EB-APの構造の結晶学データ(34)を示す図である。

図44は、EB-APの構造の結晶学データ(35)を示す図である。

図45は、EB-APの構造の結晶学データ(36)を示す図である。

実施例5 野生型EB-APと5'-イノシン酸の結合様式モデルの推測

イノシンのEB-APに対するKm値は100mMを超えることから、結合様式をX線結晶構造解析で決定できるほど親和性が高くない。実際に、グルコース-6-サルフェートやアデノシン-チオモノホスフェートといったEB-APの阻害剤となる化合物を野生型EB-APの結晶にソーキングした後、X線回折データを収集し、電子密度マップを作成したが、これら化合物に対応する電子密度は観測されなかった。そこで、コンピュータグラフィックスを用いて、5'-イノシン酸とEB-APの結合様式の推測(いわゆる、ドッキングスタディ)を行うこととした。プログラムはQUANTAを用いた。結晶構造中、活性部位中央に硫酸イオンが見出されたので、ここに、5'-イノシン酸のリン酸基を重ね合せた。更に、G74D及びI153Tの変異が5'-イノシン酸のEB-APに対するKm値を低下させることが知られていたので、5'-イノシン酸はG74及びI153から遠くないところに結合すると判断し、5'-イノシン酸の位置を決めた。その際、5'-イノシン酸を構成する原子とEB-APを構成する原子がお互いにおつからないようにした。こうして構築したモデルにおいて、I153がTになると、置換されたスレオニンの側鎖のγ酸素原子とイノシンのリボースの2'水酸基が水素結合を形成する。また、プログラムGRASPを用いてEB-APの静電ポテンシャル表示をしたところ、正電荷を帯びるイノシン塩基は、EB-AP分子表面で負電荷を帯びている領域と相互作用しており、モデルがもっともらしいことが示唆された。

実施例 6 G 7 4 D / I 1 5 3 T 変異型 E B - A P の結晶構造解析

G 7 4 D / I 1 5 3 T 変異型 E B - A P は、ホスファターゼ活性に対するリン酸基転移活性の比率が高まっており、それに伴い、ヌクレオシド-5'-リン酸の生産能力も向上している。これは、ヌクレオシドとの K_m 値が低下したこと、すなわち、ヌクレオシドとの親和性が向上したことが原因として考えられている。この変異型 E B - A P の結晶構造を決定し、野生型 E B - A P の結晶構造と比較すれば、ヌクレオシドとの親和性向上の分子機構が解明されることを期待した。

常温で、最高 2.4 Å 分解能データまでの X 線回折データを測定した。単位格子の体積、空間群、酵素の分子量から見積もって、非対称単位には 6 量体の分子 1 つが含まれることが予想された。そこで、野生型 E B - A P の 6 量体構造を探索モデルとして、プログラム amore を用いて分子置換法により解析を行った。rotation search においては 1.0 ~ 3 Å 分解能のデータを、translation search においては 1.0 ~ 4 Å 分解能のデータを用いた。両サーチともに、正解がトップピークとして現れた。分子を剛体として精密化を行ったところ、R 因子は 37.3 % に低下した。この後、QUANTA を用いたグラフィックス上での構造修正と X-PLOR を用いた構造精密化を繰り返し行い、1.0 ~ 2.4 Å 分解能において、R 因子 19.9 % のモデルを得た。

実施例 5 と同様の方法で、5'-イノシン酸と G 7 4 D / I 1 5 3 T 変異型 E B - A P の結合モデルを作成したところ、置換された Thr 1 5 3 の側鎖の γ 酸素原子は、イノシンのリボースの水酸基と水素結合を形成することが予想された。また、もう一つ置換が施された Asp 7 4 を含むループの揺らぎが、野生型に比べ G 7 4 D / I 1 5 3 T 変異型 E B - A P の方が大きくなっていることが、温度因子を比較することにより分かった。このループはイノシンの塩基と相互作用することが予想されるが、揺らぎが大きくなったことにより塩基との結合がしやすくなった可能性が示唆される。

実施例 7 野生型 E B - A P と モ リ ブ デ ン 酸 と の 複 合 体 (反 応 中 間 体 ア ナ ロ グ) の 結 晶 構 造 解 析

E B - A P の 酵 素 反 応 に お い て 、 ま ず 初 め に 、 リ ン 酸 モ ノ エ ス テ ル 結 合 が 切 断 さ れ 、 リ ン 酸 基 は 活 性 残 基 の His 1 8 9 と 共 有 結 合 を 形 成 す る 。 こ の 状 態 の 酵 素 分 子 を 反 応 中 間 体 と 呼 ぶ 。 反 応 中 間 体 は 速 や か に 、 水 あ る い は ア ル コ ー ル に よ る ア タ ッ ク を 受 け 、 そ の 結 果 、 リ ン 酸 イ オ ン が 離 脱 す る 。 水 が ア タ ッ ク す れ ば ホ ス フ ァ タ ー ゼ 活 性 が 発 揮 さ れ る こ と と な り 、 ま た 、 ア ル コ ー ル が ア タ ッ ク す れ ば リ ン 酸 基 転 移 活 性 が 発 揮 さ れ る こ と に な る 。 い ず れ に し て も 、 反 応 中 間 体 は 不 安 定 で あ り 、 そ の 構 造 を X 線 結 晶 構 造 解 析 に よ り 決 定 す る こ と は 不 可 能 で あ る 。 し か し 、 リ ン 酸 の 代 わ り に モ リ ブ デ ン 酸 が His 1 8 9 に 共 有 結 合 し た も の (反 応 中 間 体 ア ナ ロ グ) は 、 水 に よ る ア タ ッ ク を 受 け な い の で 安 定 に 存 在 す る 。

リ ン 酸 基 転 移 反 応 に お い て は 、 反 応 中 間 体 に リ ン 酸 受 容 体 が 結 合 し 、 リ ン 酸 モ ノ エ ス テ ル 結 合 が 形 成 さ れ る 。 し た が っ て 、 ヌ ク レ オ シ ド と の 結 合 様 式 を 推 定 す る 目 的 に お い て は 、 遊 離 型 構 造 よ り も 、 反 応 中 間 体 構 造 を 用 い る 方 が 適 切 で あ る 。 反 応 中 間 体 と ヌ ク レ オ シ ド と の ド ッ キ ン グ ス タ デ ィ を 行 う 目 的 で 、 反 応 中 間 体 ア ナ ロ グ の 結 晶 構 造 解 析 を 行 っ た 。

常 温 に て 、 最 高 2 . 4 Å 分 解 能 デ ー タ ま で の X 線 回 折 デ ー タ を 測 定 し た 。 単 位 格 子 の 体 積 、 空 間 群 、 酵 素 の 分 子 量 か ら 見 積 も っ て 、 非 対 称 単 位 に は 6 量 体 の 半 分 、 す な わ ち 、 サ ブ ユ ニ ッ ト 3 つ が 含 ま れ る こ と が 予 想 さ れ た 。 そ こ で 、 3 回 軸 に よ っ て お 互 い が 関 係 づ け ら れ る 3 量 体 構 造 を 作 製 し 、 分 子 置 換 法 の 探 索 モ デ ル と し た 。 rotation search に お い て は 1 0 ~ 3 Å 分 解 能 の デ ー タ を 、 translation search に お い て は 1 0 ~ 4 Å 分 解 能 の デ ー タ を 用 い た 。 両 サ ー チ と も に 、 正 解 が ト ッ プ ピ ー ク と し て 現 れ た 。 分 子 を 剛 体 と し て 精 密 化 を 行 っ た と こ ろ 、 R 因 子 は 4 2 . 4 % に 低 下 し た 。 こ の 後 、 QUANTA を 用 い た グ ラ フ ィ ッ ク ス 上 で の 構 造 修 正 と X - P L O R を 用 い た 構 造 精 密 化 を 繰 り 返 し 行 い 、 8 ~ 2 . 4 Å 分 解 能 に お い て 、 R 因 子 2 2 . 3 % の モ デ ル を 得 た 。 非 対 称 単 位 に は 6 量 体 の 分 子 半 分 、 つ ま り サ ブ ユ ニ ッ ト 3 つ が 含 ま れ る 。

実施例 8 モルガネラ・モルガニ(Morganella morganii)由来酸性ホスファターゼ (MM-AP) 由来 G 7 2 D / I 1 5 1 T 変異型酵素の結晶化及び結晶構造解析

ハンギングドロップ法での蒸気拡散を利用して MM-AP の G72D/I151T 二重変異体の結晶化を行った。当該蛋白質溶液 (濃度 40mg/ml) と、25 (w/v%) のポリエチレングリコール 1000、25mM 硫酸、25mM DTT を含む 125mM クエン酸緩衝液 (pH4.8) を同量ずつ (各々 5 μ l)、シリコナイゼーションしたカバーガラス上に滴下混合し、25 (w/v%) のポリエチレングリコール 1000、25mM 硫酸、25mM DTT を含む 125mM クエン酸緩衝液 (pH4.8) 500 μ l を満たした well の上に混合液滴が釣り下がるようにかぶせ、20 $^{\circ}$ C にて静置した。2、3 日後に結晶が析出し、1 週間後には測定可能な大きさ (0.4 \times 0.4 \times 0.3mm 程度) に成長した。

(株)リガクの X 線回折装置 R-AXIS IIc を用いて、X 線回折データを収集し、結晶学的パラメーターを決定した。空間群は P2₁2₁2₁、格子定数は a=90.64 \AA 、b=119.74 \AA 、c=136.14 \AA となった。筑波・高エネルギー研究所シンクロトン放射光施設 BL-6B 上、100K で、2.6 \AA 分解能データまでの回折データを測定した。

単位格子の体積、空間群、酵素の分子量から見積もって、非対称単位には 6 量体の分子 1 つが含まれることが予想された。そこで、野生型 EB-AP の 6 量体構造を探索モデルとして、プログラム amore を用いて分子置換法により解析を行った。rotation search においては 10 \sim 3 \AA 分解能のデータを、translation search においては 10 \sim 4 \AA 分解能のデータを用いた。両サーチともに、正解がトップピークとして現れた。分子を剛体として精密化を行った後、QUANTA を用いたグラフィックス上での構造修正と X-PLOR を用いた構造精密化を繰り返し行い、10 \sim 2.6 \AA 分解能において、R 因子 0.197 のモデルを得た。

図 1 に示した 5 つの活性残基 (Lys 113、Arg 120、His 148、Arg 181、His 187) の C α 原子間の距離を表 2 に示した。EB-AP の類縁酵素である MM-AP において、活性残基間のすべての原子間距離が、EB-AP の立体構造から規定した範囲におさまっていることが確認された。

表 2

		G72D/I151T 変異型MM-AP	下限	上限
Lys113	Arg120	11.3 Å	10.4 Å	12.6 Å
	His148	12.6 Å	11.3 Å	13.8 Å
	Arg181	16.3 Å	14.5 Å	17.4 Å
	His187	12.5 Å	10.7 Å	13.6 Å
Arg120	His148	14.0 Å	12.2 Å	15.2 Å
	Arg181	10.9 Å	9.4 Å	11.8 Å
	His187	6.1 Å	4.5 Å	6.7 Å
His148	Arg181	8.9 Å	6.7 Å	9.8 Å
	His187	10.2 Å	8.8 Å	11.0 Å
Arg181	His187	5.4 Å	4.5 Å	6.8 Å

実施例 9 E B - A P 反応中間体とイノシンの結合様式モデルの推測

コンピュータグラフィックス上、QUANTAを用いて、結合様式モデルを構築した(図3)。モリブデン酸はそのままリン酸に置き換えた。イノシンは、野生型 E B - A P と 5'-イノシン酸の結合様式モデルにおける 5'-イノシン酸のヌクレオシド部分近くに置いた。ただし、当然のことだが、イノシンはリン酸モノエステル結合を持たないので、5'-イノシン酸をドッキングさせるよりも自由度が高い。したがって、イノシンが E B - A P の分子表面に、より好ましい状態で結合するように、イノシンの位置の微調整を行い、結合様式モデルとした。以降の変異型酵素のデザインには、このモデルを用いることとした。

実施例 10 ヌクレオシドとの親和性向上を目指した変異型 E B - A P のデザイン

実施例 8 で構築したモデルによると、Ser 72 の側鎖は、イノシンの塩基と相互作用する可能性が示唆された。この残基をフェニルアラニン、チロシン、トリプトファンといった芳香族アミノ酸に置換すると、芳香環とヌクレオシド塩基との間に π - π 相互作用が生じ、ヌクレオシドの E B - A P に対する親和性が向上することが予測された。同様に、バリン、ロイシン、イソロイシンといった分岐鎖疎水性アミノ酸に置換すると、分岐鎖疎水基とヌクレオシド塩基との間に C H

／ π 相互作用が生じ、また、グルタミン酸、アスパラギン酸といった負電荷を帯びたアミノ酸に置換すると、ヌクレオシド塩基の正電荷と静電的に引き合い、親和性の向上が見込まれた。そこで、ホスファターゼ活性よりもリン酸基転移活性が相対的に高まっているG 7 4 D／I 1 5 3 T変異型EB－APのリン酸基転移活性を更に高めるため、該変異型EB－APのS 7 2 F, S 7 2 Y, S 7 2 W, S 7 2 V, S 7 2 E, S 7 2 D変異体を作製することとした。なお、S 7 2を他のアミノ酸に置換した変異体も作製することとした。ちなみに、これらの変異体は、3残基置換変異型EB－APとなる。

実施例 1 1 Ser 7 2 を他のアミノ酸へ置換した 3 残基置換変異型 EB－AP の作製

エシェリヒア・コリJM109で発現するための変異型EB－APを構築するために、G 7 4 D／I 1 5 3 T変異型EB－AP遺伝子を含むプラスミドpEPI 3 4 0を、PCRを用いる部位特異的突然変異誘発法の鋳型として使用した。しかし、これらプラスミドpEPI 3 0 5及びpEPI 3 4 0の塩基配列は、特開平10－201481号公報の段落番号(0143)の表12に明記されている。また、プラスミドpEPI 3 0 5をエシェリヒア・コリJM109に保持させた株は、AJ13144と命名され、1996年2月23日に、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(郵便番号305-8566 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号)にFERM BP－5423として国際寄託されている〔上記公開公報の段落番号(0105)～(0110)の記載参照〕。

変異はストラタジーン(Stratagene)社(アメリカ)の「クイックチェンジ部位特異的突然変異誘発キット(Quickchange Site-Directed Mutagenesis Kit)」を使用し、製造元のプロトコールに従って、各種変異型酵素に対応するプライマー(図7、配列番号11～61)を用いて導入した。PCR反応の生成物を用いて、エシェリヒア・コリXL－1を形質転換した。形質転換細胞を、100 μ l/mlのアンピシリンを含むL寒天培地プレート上に塗抹し、37℃で16時間インキュベートした。生成したコロニーを採取し、100 μ l/mlのアンピシリンを含むL培地で一晩振とうしながら培養した。培養液から遠心分離により菌

体を回収後、ファルマシア社（スウェーデン）のFlexiPrep Kitを使用し、製造元のプロトコールに従って、プラスミドの抽出を行った。各種3残基置換変異型EB-A Pをコードする塩基配列は、DNA配列分析によって確認した。

なお、図7に示したプライマーセットの合成は(株)日本バイオサービスに委託した。

実施例12 変異型EB-A Pのリン酸基転移活性及び反応速度定数の測定

各種3残基置換変異型EB-A P遺伝子を含むプラスミドを導入したエシェリヒア・コリJM109を100 μ l/mlのアンピシリンを含むL培地50 mlに接種し、37℃で16時間培養した。培養液から遠心分離で菌体を集め、25 mMリン酸バッファー(pH 7.0)3 mlに懸濁し、4℃で20分間超音波処理を行い破碎した。処理液を遠心分離して不溶性画分を除き、無細胞抽出液を調製した。各EB-A P 3残基置換変異型酵素が発現していることは、SDS-PAGEで確認した。発現量は、全蛋白質の20%程度であった。

無細胞抽出液のリン酸基転移活性は以下の条件で測定した。2 mMイノシン、100 mMピロリン酸ナトリウム、100 mM酢酸バッファー(pH 4.0)、100 μ lの無細胞抽出液を含む反応液(1 ml)を、pH 4、30℃で10分間インキュベートした。1 N塩酸200 μ lを加え反応を停止させた後、遠心分離により沈殿を除き、生成した5'-イノシン酸を定量した。各種3残基置換変異型EB-A Pのリン酸基転移活性を、変異を導入する対象としたG74D/I153T変異型EB-A Pを用いたときの5'-イノシン酸生成量を1とした相対活性で示した。

続いて、各種3残基置換変異型EB-A Pのリン酸基転移反応におけるイノシンに対するK_m値を以下の条件で測定した。100 mMピロリン酸ナトリウム、100 mM酢酸バッファー(pH 4.0)、10-100 mMイノシン、100 μ lの無細胞抽出液を含む反応液(1 ml)をpH 4、30℃で10分間インキュベートした。1 N塩酸200 μ lを加え反応を停止させた後、遠心分離により沈殿を除き、生成した5'-イノシン酸を定量した。Hanes-WoolfプロットによりK_m値を算出した。表3に結果を示す。

表 3

	K _m 値	リン酸転移活性
S72F/G74D/I153T	20mM	2.80
S72Y/G74D/I153T	25mM	2.04
S72W/G74D/I153T	30mM	1.71
S72D/G74D/I153T	33mM	1.59
S72V/G74D/I153T	40mM	2.46
S72E/G74D/I153T	40mM	3.19
S72M/G74D/I153T	46mM	1.94
S72T/G74D/I153T	50mM	1.91
S72L/G74D/I153T	57mM	2.24
S72R/G74D/I153T	59mM	1.99
S72Q/G74D/I153T	77mM	2.42
S72K/G74D/I153T	78mM	1.53
S72P/G74D/I153T	109mM	1.34
S72A/G74D/I153T	115mM	0.78
S72N/G74D/I153T	124mM	0.43
S72G/G74D/I153T	137mM	0.43
S72H/G74D/I153T	n.d.	n.d.
G74D/I153T	100mM	1.00
10残基置換変異型酵素	40mM	1.44

実施例 10 にて、 π - π 相互作用、CH/ π 相互作用、静電相互作用によりイノシンとの親和性が向上するであろうと予測されたすべての変異体(S72F, S72Y, S72W, S72V, S72E, S72D)のイノシンに対するK_m値が、変異導入しないG74D/I153T変異型EB-A Pのものに比べて低下し、イノシンに対する親和性が向上した。また、リン酸基転移活性についても向上が見られた。特に、S72Fを導入した変異体が、K_m値、リン酸基転移活性、双方において、改善が著しかった。フェニルアラニンの芳香環とイノシン塩基が適当な位置関係で π - π 相互作用し、親和性の向上が図られたものと推測される。また、S72M, S72T, S72R, S72Q, S72K変異体のK_m値も低下した。これらアミノ酸残基とヌクレオシド塩基の間に疎水性相互作用、水素結合等何らかの好ましい相互作用が生じたものと考えられる。ちなみに、S72Iについては、遺伝子を作製できなかった。また、S72Cは、誤ったS-S結合を形

成させる危険性があるので、作製しなかった。

なお、5'-イノシン酸は、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により、下記の条件にて分析した。

カラム：Cosmosil 5 C 18-AR (4.6 × 150 mm) ナカライテスク社製品

移動相：5 mM リン酸カリウムバッファー (pH 2.8) / メタノール = 95 / 5

流速：1.0 ml/min

温度：室温

検出：UV 245 nm

実施例 13 S 7 2 F / G 7 4 D / I 1 5 3 T 変異型 EB - AP 遺伝子を導入したエシェリヒア・コリ JM109 を用いた 5' - イノシン酸の生産

G 7 4 D / I 1 5 3 T 変異型、10 残基置換変異型、及び S 7 2 F / G 7 4 D / I 1 5 3 T 変異型 EB - AP 遺伝子を含むプラスミドを導入したエシェリヒア・コリ JM109 をアンピシリン 100 μ g/ml 及び IPTG 1mM を含む L 培地 50 ml に接種し、37°C で 16 時間培養した。

ピロリン酸 12 g/dl、及びイノシン 6 g/dl を酢酸バッファー (pH 4.0) に溶解し、これに上記の各変異型 EB - AP 遺伝子を導入したエシェリヒア・コリ JM109 の菌体を乾燥菌体重量で 100 mg/dl となるように添加し、pH を 4.0 に維持しながら、30°C で 24 時間反応を行った。生成した 5'-イノシン酸の量を測定した結果を表 4 に示した。なお、生成したイノシン酸は 5'-イノシン酸のみで 2'-イノシン酸及び 3'-イノシン酸の副生は全く認められなかった。

G 7 4 D / I 1 5 3 T 変異型 EB - AP 遺伝子を含むプラスミドを導入したエシェリヒア・コリ JM109 を用いた反応では 7.5 g/dl の 5'-イノシン酸が生成蓄積したが、反応時間を伸ばしてもそれ以上蓄積は増加しなかった。10 残基置換変異型 EB - AP 遺伝子を含むプラスミドを導入したエシェリヒア・コリ JM109 を用いた反応では蓄積が向上し、12.1 g/dl の 5'-イノシン酸が生成蓄積した。立体構造に基づいて設計し、構築した S 7 2 F / G 7 4 D / I 1 5 3

T変異型EB-A P遺伝子を含むプラスミドを導入したエシェリヒア・コリJM109を用いた反応では更に生産性が向上し、13.2 g/dlの5'-イノシン酸が生成蓄積した。

表 4

導入した変異型酵素遺伝子	生成イノシン酸(g/dl)
G74D/I153T	7.5
10残基置換変異型	12.1
S72F/G74D/I153T	13.2

実施例 14 L16W, S71W, S73W, E104F, E104W変異を導入した3残基置換変異型EB-A Pのリン酸基転移活性及び反応速度定数の測定

S72F変異が、 π - π 相互作用によりイノシンとの親和性を向上させたと考えられるため、コンピューターグラフィックス上で、芳香環アミノ酸への置換によりイノシン塩基との π - π 相互作用が図れる他のアミノ酸残基を探索した。その結果、L16W, S71W, S73W, E104F, E104W変異により置換された芳香環がイノシン塩基と相互作用する可能性が示唆された。そこで、これら5種の(G74D/I153T変異型EB-A Pをベースとした)3残基置換変異型EB-A Pを実施例11に記述した方法(各変異型酵素に対応するプライマーは図8Aに示した。配列番号62~76)で作製し、実施例12に記述した方法でリン酸基転移活性及び反応速度定数を測定した。結果を表5に示す。リン酸基転移活性はいずれの変異型酵素においても低下したが、Km値はすべての変異型酵素で低下し、イノシンとの親和性が向上したことが示唆された。Leu16は、イノシンとの相互作用が確実視されるSer72から(C α 間距離で)10 Å離れているが、この程度離れていてもイノシンとの相互作用が可能であることが示された。

なお、図8Aに示したプライマーセットの合成は、(株)日本バイオサービスに委託した。

表 5

	K _m 値	リン酸転移活性
L16W/G74D/I153T	33mM	0.21
S71W/G74D/I153T	75mM	0.26
S73W/G74D/I153T	29mM	0.77
E104F/G74D/I153T	61mM	0.65
E104W/G74D/I153T	67mM	0.26
G74D/I153T	100mM	1.00
10残基置換変異型酵素	40mM	1.44

実施例 15 A 7 2 F、A 7 2 E 変異を導入した 1 0 残基置換変異型 E B - A P の作製、及びリン酸転移活性と反応速度定数の測定

実施例 1 2 において、最も K_m 値を低下させた S 7 2 F と最も活性を高めた S 7 2 E 変異を、1 0 残基置換変異型 E B - A P に導入した。1 0 残基置換変異型 E B - A P においては、S e r 7 2 が A l a に置換されているので、実際には、A 7 2 F と A 7 2 E 変異を導入することとなる。野生型 E B - A P を基準とすると、双方とも 1 0 残基が置換されている。これら 2 種の変異体を実施例 1 1 に記述した方法（各変異型酵素に対応するプライマーは図 8 B に示した。配列番号 7 7 ~ 8 2）で作製した。P C R を用いる部位特異的突然変異誘発法の鋳型としては、1 0 残基置換変異型 E B - A P 遺伝子を含むプラスミド pEMP370（特開平 9-3 7785、実施例 1 9）を使用した。更に、実施例 1 2 に記述した方法でリン酸転移活性及び反応速度定数を測定した。結果を表 6 に示す。リン酸転移活性は、G 7 4 D / I 1 5 3 T 変異型 E B - A P を用いたときの 5' - イノシン酸生成量を 1 とした相対活性で示した。いずれの変異型酵素においても、K_m 値は顕著に低下した。リン酸転移活性については、A 7 2 F 変異により低下したのに対し、A 7 2 E 変異により上昇した。

表 6

	K m 値	リン酸転移活性
A72F/10残基置換変異型酵素	9mM	0.11
A72E/10残基置換変異型酵素	15mM	2.30
10残基置換変異型酵素	40mM	1.44

実施例 16 A 7 2 F / 1 0 残基置換変異型 E B - A P 及び A 7 2 E / 1 0 残基置換変異型遺伝子を導入したエシェリヒア・コリ J M 109 を用いた 5' - イノシン酸の生産

A 7 2 F / 1 0 残基置換変異型 E B - A P 及び A 7 2 E / 1 0 残基置換変異型遺伝子を含むプラスミドを導入したエシェリヒア・コリ J M 109 を用いての 5' - イノシン酸の生産実験を実施例 1 3 に記述した方法で行った。結果を表 7 に示す。両変異体とも 5' - イノシン酸の蓄積量が増加した。

表 7

導入した変異型酵素遺伝子	生成イノシン酸(g/dl)
A72F/10残基置換変異型	13.9
A72E/10残基置換変異型	13.9
10残基置換変異型	12.1

実施例 17 I 1 0 3 D、T 1 5 3 N 変異を導入した変異型 E B - A P の作製、及びリン酸転移活性及び反応速度定数の測定

I 1 0 3 D 変異により、置換された A s p がイノシン塩基と静電相互作用をすること、また、T 1 5 3 N 変異により、置換された A s n がリボースの水酸基と水素結合を形成することが図 3 のモデルにより示唆された。そこで、G 7 4 D / I 1 5 3 T 変異型 E B - A P にこれらの残基を導入し、I 1 0 3 D / G 7 4 D / I 1 5 3 T 変異型 E B - A P と G 7 4 D / I 1 5 3 N 変異型 E B - A P を実施例 1 に記述した方法（各変異型酵素に対応するプライマーは図 8 C に示した。配列

番号 83～88) で作製することとした。更に、実施例 12 に記述した方法でリン酸転移活性及び反応速度定数を測定した。結果を表 8 に示す。リン酸転移活性は、G74D/I153T 変異型 EB-AP を用いたときの 5'-イノシン酸生成量を 1 とした相対活性で示した。両変異体ともに、リン酸基転移活性は低下したが、K_m 値は低下し、イノシンとの親和性が向上したことが示唆された。

表 8

	K _m 値	リン酸転移活性
I103D/G74D/I153T	51mM	0.09
G74D/I153N	38mM	0.18
G74D/I153T	100mM	1.00

実施例 18 Leu140 を P h e、G l u、L y s に置換した変異型 EB-AP の作製、及びリン酸転移活性と反応速度定数の測定

Leu140 は、Ser72 から 10 Å 以上離れているが、反応中間体アナログの立体構造において、リン酸結合部位の直近に位置する。したがって、この残基を置換すれば、反応中間体におけるリン酸結合部位周辺の構造が変化し、ひいては、ヌクレオシド結合部位の構造と揺らぎにも影響が及ぶものと考えられた。この残基を、よりかさ高い P h e、正電荷を有する L y s、負電荷を有する G l u、に置換すれば、ヌクレオシドとの親和性が変化するのではないかと期待される。変異は、実施例 15 においてリン酸転移活性が高かった A72E/10 残基置換体を導入することとした。これら 3 種の変異体を実施例 11 に記述した方法（各変異型酵素に対応するプライマーは図 8 D に示した。配列番号 89～97）で作製した。P C R を用いる部位特異的突然変異誘発法の鋳型としては、A72E/10 残基置換変異型 EB-AP 遺伝子を含むプラスミドを使用した。更に、実施例 12 に記述した方法でリン酸転移活性及び反応速度定数を測定した。結果を表 9 に示す。リン酸転移活性は、G74D/I153T 変異型 EB-AP を用いたときの 5'-イノシン酸生成量を 1 とした相対活性で示した。

表 9

	K _m 値	リン酸転移活性
A72E/L140F/10残基置換変異型酵素	9mM	1.66
A72E/L140K/10残基置換変異型酵素	78mM	0.07
A72E/L140E/10残基置換変異型酵素	322mM	0.16
A72E/10残基置換変異型酵素	15mM	2.30

L 1 4 0 F を導入した変異体は、K_m値が低下した。逆に、L 1 4 0 K 及び L 1 4 0 E 変異は、K_mを大幅に上昇させた。

実施例 19 エンテロバクター・アエロゲネス IF0 12010 由来野生型酸性ホスファターゼの精製とN末端アミノ酸配列の決定

特開平10-201481の実施例24記載のエシェリヒア・コリ JM109/pENP110の培養菌体からエンテロバクター・アエロゲネスIF012010由来の酸性ホスファターゼを精製してN末端アミノ酸配列を決定し、成熟タンパク質のアミノ酸配列を決定した。エシェリヒア・コリ JM109/pENP110はエンテロバクター・アエロゲネスIF012010由来の酸性ホスファターゼ遺伝子をエシェリヒア・コリJM109株に導入した菌で、該酸性ホスファターゼを生産する。該酸性ホスファターゼ遺伝子の塩基配列より予想される前駆体タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号10に示される配列に相当する。尚、配列番号10に示すアミノ酸配列は、L61Q/A63Q/E64A/N67D/S69A/G72D/T133K/E134D/I151T変異型EA-APのアミノ酸配列である。

ペプトン1g/dl、酵母エキス0.5g/dl及び食塩1g/dlを含有する栄養培地（pH7.0）50mlを500ml坂口フラスコに入れ、120℃にて20分間加熱殺菌した。これにエシェリヒア・コリ JM109/pENP110を一白金耳接種し、30℃で16時間振盪培養した。培養液から遠心分離により菌体を回収した菌体を100mLの100mM燐酸カリウムバッファー（pH7.0）に懸濁し、4℃で20分間超音波処理を行い菌体を破碎した。処理液を遠心分離して不溶性画分を除き、無細胞抽出液を調製した。この無細胞抽出液に30%飽和となるように硫酸アンモニウムを添加した。遠心分離により生成した沈澱を除去した後、上清液に60%飽和となるように硫酸アンモニウムを追加添加した。生成した沈澱を遠心分離により回収し、100mM燐酸カリウムバッ

ファーに溶解した。この粗酵素液を100mM磷酸カリウムバッファー (pH7.0) 500mL に対し3回透析した後、20mM磷酸カリウムバッファー (pH7.0) で平衡化したDEAE-トヨパール650Mカラム (φ3.0×10.0cm) にチャージし、20mM磷酸カリウムバッファー (pH7.0) で洗浄した。磷酸転移活性は素通り画分にあったので、当該画分を回収した。この活性画分に35%飽和となるように硫酸アンモニウムを添加し、これを35%飽和硫酸アンモニウムを含む20mM磷酸カリウムバッファー (pH7.0) で平衡化したブチルトヨパールカラム (φ3.0×7.0cm) に吸着させた。これを35%飽和から20%飽和磷酸カリウムバッファー (pH7.0) の直線的な濃度勾配で溶出した。活性画分を集め、10mM磷酸カリウムバッファー (pH6.0) 1L に対し透析した後、10mM磷酸カリウムバッファー (pH6.0) で平衡化したCM-Toyopearlカラム (φ3.0×7.0cm) に吸着させた。これを0mMから300mM 塩化カリウムを含む磷酸カリウムバッファー (pH6.0) の直線的な濃度勾配で溶出した。この活性画分を集めた。

以上の操作によって、磷酸転移活性を示す酵素を無細胞抽出液より最終的に約16%の回収率で約5倍に精製した。この酵素標品は、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動において均一であった。

本精製酵素をDITCメンブレン (Milligen/Biosearch社製) に吸着させ、Prosequencer 6625 (Milligen/Biosearch社製) を用いてN末端のアミノ酸配列を決定したところ配列番号98に示した5残基のN末端のアミノ酸配列が決定された。精製酵素のN末端は配列番号10の配列の21番目 (アミノ酸番号1) のロイシン残基から開始していたため、配列番号10に示されるアミノ酸配列は前駆体蛋白質の配列であり、1番目のメチオニン残基 (アミノ酸番号-20) から20番目のアラニン残基 (アミノ酸番号-1) までのペプチドは翻訳後に除去されるものと考えられた。この結果より成熟体タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号10の配列中、アミノ酸番号1~228に示される配列に相当すると考えられた。

実施例20 エンテロバクター・アエロゲネス(Enterobacter aerogenes)由来酸性ホスファターゼ(EA-AP)の変異型酵素遺伝子の作製と該遺伝子を導入したエシェリヒア・コリJM109を用いた5'-イノシン酸の生産

EB-APにおいてイノシンのリン酸基転移活性を向上させたS72F/G74D/I153Tの3つの変異に相同な変異をEA-APに導入することとした。EB-APとEA-AP（野生型）のアミノ酸配列をプログラムBLASTを用いて、アラインメントした結果を図9に示す。EB-APのSer72/Gly74/Ile153は、EA-APにおいては、Ala70/Gly72/Ile151に対応することが示された。そこで、A70F/G72D/I151T変異型EA-APを実施例11に記述した方法で作製した。変異型酵素遺伝子を含むプラスミドを導入したエシェリヒア・コリJM109を用いて、イノシンから5'-イノシン酸の生産を実施例13に記述した方法で行った。結果を表10に示す。A70F/G72D/I151T変異型EA-APは、S72F/G74D/I153T変異型EB-APと同等の5'-イノシン酸生産能を示した。

表 1 0

導入した変異型酵素遺伝子	生成イノシン酸(g/dl)
EA-AP A72F/G74D/I153T	13.1
EB-AP S72F/G74D/I153T	13.2

なお、図9はEB-APとエンテロバクター・アエロゲネス由来酸性ホスファターゼ（EA-AP）のアミノ酸配列アラインメントをプログラムBLASTにより行った結果を示す図である。上段がEB-AP、下段がEA-APである。中段には、両者のアミノ酸残基が同一であればその残基名が、同一でなくても類似のアミノ酸残基であれば、+が表示される。EB-APの72番目の残基（Ser72）の位置を、[72]でマークした。EA-APで対応する残基はAla70である。

実施例 2 1 エンテロバクター・アエロゲネス IF0 12010 由来新規変異型酸性ホスファターゼ遺伝子のプロモーター配列の改変による酵素の高発現

エンテロバクター・アエロゲネス IF0 12010由来変異型酸性ホスファターゼをコードする遺伝子のプロモーター配列部分に遺伝子工学的手法によって部位特異

的変異を導入し、酵素発現量の増加した変異型酸性ホスファターゼをコードする遺伝子を構築した。変異を導入する遺伝子としては、L61Q/A63Q/E64A/N67D/S69A/G72D/T133K/E134D/I151T変異型EA-APをコードする変異型EA-AP遺伝子を含むプラスミドpENP170を用いた。pENP170は以下のようにして調製した。

特開平10-201481号公報の実施例24記載の方法にて取得したエンテロバクター・アエロゲネス IF0 12010由来野生型酸性ホスファターゼをコードする遺伝子を含むプラスミドpENP110より、野生型酸性ホスファターゼをコードする遺伝子を含む、制限酵素SalIと制限酵素KpnIで切り出される1.6kbpの大きさのDNA断片を切り出し、SalI及びKpnIで切断したpUC19（酒造社製）に結合し、このプラスミドをpENP120と命名した。pENP120に、部位特異的変異法により、下記の変異を導入し、pENP170を得た。pENP170中のSalI-KpnI 1.6kbp DNA断片の塩基配列は配列番号9に示される配列である。

72Gly(GGC) → Asp(G*AC)
151Ile(ATC) → Thr(A*CC)
61Leu(CTG) → Gln(C*AG)
63Ala(GCT) → Gln(*C*A*G)
64Glu(GAA) → Ala(G*CA)
67Asn(AAC) → Asp(*GAC)
69Ser(AGC) → Ala(*G*CC)
133Thr(ACC) → Lys(A*A*A)
134Glu(GAG) → Asp(GA*C)

pENP170に含まれる変異型EA-AP遺伝子のプロモーター配列部分への変異導入はStratagene社製のクイックチェンジ部位特異的突然変異誘発キット（Quick Change site-directed mutagenesis kit）を用いた。DNA合成装置（アプライドバイオシステム社製モデル394）を用いて合成した変異導入用オリゴヌクレオチドMUT170（配列番号99）、MUT171（配列番号100）、および鋳型としてpENP170を用いてStratagene社のプロトコールに従って変異を導入した。

得られたプラスミドDNAを用いて常法によりエシェリヒア・コリJM109（宝

酒造製)を形質転換した。これを100 μ g/mlのアンピシリンを含むL寒天培地上にプレーティングし、形質転換体を得た。形質転換体よりアルカリ溶菌法によりプラスミドを調製し、塩基配列の決定を行い、目的の塩基が置換されていることを確認した。塩基配列の決定は Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオケミカル社製)を用い、サンガーらの方法(J. Mol. Biol., 143, 161 (1980))に従って行った。

このようにしてエンテロバクター・アエロゲネス IF0 12010由来推定酸性ホスファターゼの上流に位置する推定プロモーター配列の-10領域の塩基配列がAAAAATからエシェリヒア・コリのlacプロモーターと同じTATAATという塩基配列に変異した変異型遺伝子をコードする変異型遺伝子を構築した。この変異型遺伝子を含むプラスミドをpENP180と命名した。

エシェリヒア・コリ JM109/pENP170およびプロモーター配列の-10領域を改変した遺伝子を導入したエシェリヒア・コリJM109/pENP180をアンピシリン100 μ g/mlを含むL培地50ml、およびIPTG1mMを添加したアンピシリン100 μ g/mlを含むL培地50mlにそれぞれ接種し、37°Cで16時間培養した。それぞれの菌の培養液から遠心分離により菌体を集め、生理食塩水で1回洗浄した。ピロリン酸15g/dl、およびイノシン、8g/dlを100mM酢酸バッファー(pH4.0)に溶解し、これにそれぞれの菌体を乾燥菌体重量で100mg/dlとなるように添加し、pHを4.0に維持しながら、30°Cで1時間反応させた。生成した5'-イノシン酸の量を表11に示した。

イノシン及び5'-イノシン酸は、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により、下記の条件にて分析した。

カラム: Cosmosil 5C18-AR (4.6 \times 150mm) [ナカライテスク社製品]

移動相: 5mM 燐酸カリウムバッファー(pH 2.8) / メタノール = 95/5

流速: 1.0ml/min

温度: 室温

検出: UV245nm

エシェリヒア・コリJM109/pENP170ではIPTG無添加では活性が低かったが、エシ

エリヒア・コリJM109/pENP180はIPTGを添加しなくても高い活性を示した。また、エシェリヒア・コリJM109/pENP180はIPTGを添加することでさらに高い活性を発現し、プロモーター領域の改変が有効であることが示された。

表 1 1

菌株	IPTG	生成5'-イノシン酸(g/dl)
エシェリヒア・コリ JM109/pENP170	無添加	0.73
	1 mM添加	3.09
エシェリヒア・コリ JM109/pENP180	無添加	2.86
	1 mM添加	3.37

実施例 2 2 ヌクレオシドに対する親和性の向上したエンテロバクター・アエロゲネス IF0 12010 由来新規変異型酸性ホスファターゼ遺伝子の構築

実施例 2 1 にて構築したエンテロバクター・アエロゲネス IF0 12010由来変異型酸性ホスファターゼ遺伝子に遺伝子工学的手法によって部位特異的変異を導入し、ヌクレオシド、特にグアノシンに対する親和性が向上した変異型酸性ホスファターゼをコードする遺伝子を作製した。アミノ酸残基の置換はエシェリヒア・ブラッタエ酵素の立体構造解析に基づいてヌクレオシドとの親和性向上に寄与すると同定されたアミノ酸残基の置換を組み合わせて導入した。

プラスミドDNAへの変異導入はStratagene社製のクイックチェンジ部位特異的突然変異誘発キット (Quick Change site-directed mutagenesis kit) を用いた。DNA合成装置 (アプライドバイオシステム社製モデル394) を用いてMUT180 (配列番号 1 0 1) からMUT521 (配列番号 1 2 0) までの20種類の変異導入用オリゴヌクレオチドを合成した (表 1 2)。最初の鋳型としてpENP170、また変異導入用オリゴヌクレオチドとしてMUT180、MUT181を用いてStratagene社のプロトコールに従って変異を導入した。

得られたプラスミドDNAを用いて常法によりエシェリヒア・コリJM109 (宝酒造製) を形質転換した。これを100 μ g/mlのアンピシリンを含むL寒天培地上にプレーティングし、形質転換体を得た。形質転換体よりアルカリ溶菌法により

プラスミドを調製し、塩基配列の決定を行い、目的の塩基が置換されていることを確認した。塩基配列の決定は Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオケミカル社製) を用い、サンガーらの方法 (J. Mol. Biol., 143, 161 (1980)) に従って行った。このようにして153番目のスレオニン残基 (ACC) がセリン残基 (TCC) に置換した変異型酸性ホスファターゼをコードする遺伝子を構築し、この変異型遺伝子を含むプラスミドをpENP200と命名した。

変異を導入したプラスミドを新しい鋳型として同様の操作を繰り返し、累加的に部位特異的変異を導入した。形質転換体よりアルカリ溶菌法によりプラスミドを調製し、塩基配列の決定を行い、目的の塩基が置換されていることを確認した。作製した変異型酸性ホスファターゼをコードする変異型酵素遺伝子と変異部位を表13に示した。なお変異部位のアミノ酸残基は配列番号10に示したアミノ酸配中のアミノ酸残基を示している。

それぞれの変異型酸性ホスファターゼ遺伝子を含むプラスミドを導入したエシェリヒア・コリ JM109/pENP180、エシェリヒア・コリJM109/pENP320、エシェリヒア・コリJM109/pENP340、エシェリヒア・コリJM109/pENP410、エシェリヒア・コリJM109/pENP510、およびエシェリヒア・コリJM109/pENP520をアンピシリン100 μ g/mlおよびIPTG1mMを含むL培地50mlに接種し、37°Cで16時間培養した。菌体を50mlの100mM燐酸バッファー (pH7.0) に懸濁し、4°Cで20分間超音波処理を行い菌体を破碎した。それぞれの菌の培養液から遠心分離により菌体を集め、生理食塩水で1回洗浄した。処理液を遠心分離して不溶性画分を除き、無細胞抽出液を調製した。それぞれの無細胞抽出液を用いてリン酸転移反応におけるイノシンとグアノシンに対する K_m 値を測定した。

ヌクレオシドへの燐酸転移活性の測定は、イノシンおよびグアノシンを基質として次の条件で行った。各種濃度のイノシンまたはグアノシン、ピロ燐酸ナトリウム100 μ mol/ml、酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.0) 100 μ mol/ml及び酵素を含む反応液 (1ml) でpH4.0、30°Cで10分反応を行った。2N塩酸200 μ lを添加して反応を停止した後、遠心分離により沈澱を除き、燐酸転移反応により生成した5'-イノシン酸または5'-グアニル酸を定量した。イノシン、グアノシン、5'-イノシン酸および5'-グアニル酸は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

C) により、実施例 2 1 と同じ条件にて分析した。

上記の組成の反応条件においてイノシンまたはグアノシンの濃度を変化させて
 燐酸転移活性を測定し、Hanes-Woolfプロット (Biochem.J., 26,1406 (1932))
 により燐酸転移反応におけるイノシンおよびグアノシンの速度定数を求めた。そ
 の結果を表 1 4 に示した。実施例で作製した変異型酵素のKm値はグアノシンに対
 するK m値が顕著に低下し、グアノシンに対する親和性が向上していることが明
 らかになった。またpENP520にコードされる変異型酵素以外の 4 種類の変異型酵
 素はイノシンに対するK m値も非常に低下していた。

表 1 2

配列の 名称	配列 番号		長さ	配 列
MUT170	99	センス	30	5'-CTT ACA GAT GAC <u>TAT AAT</u> GTG ACT AAA AAC
MUT171	100	アンチセンス	30	5'-GTT TTT AGT CAC ATT ATA GTC ATC TGT AAG
MUT180	101	センス	33	5'-TCT ACC GGT TGG GCA <u>TCC</u> GCG CTG GTA CTG GCG
MUT181	102	アンチセンス	33	5'-CGC CAG TAC CAG CGC <u>GGA</u> TGC CCA ACC GGT AGA
MUT300	103	センス	33	5'-TCC GGC CAT ACC TCT <u>TCC</u> GGT TGG GCA TCC GCG
MUT301	104	アンチセンス	33	5'-CGC GGA TGC CCA ACC <u>GGA</u> AGA GGT ATG GCC GGA
MUT310	105	センス	33	5'-GAT GCT GAC CTG GCC <u>GTT</u> GGC GAC GTC GCG AAT
MUT311	106	アンチセンス	33	5'-ATT CGC GAC GTC GCC <u>AAC</u> GGC CAG GTC AGC ATC
MUT320	107	センス	33	5'-CTG ACA AAT ATG ATT <u>CTG</u> GAT GCC GGC GAT CTG
MUT321	108	アンチセンス	33	5'-CAG ATC GCC GGC ATC <u>CAG</u> AAT CAT ATT TGT CAG
MUT330	109	センス	33	5'-GAT GCT GAC CTG GCC <u>ATG</u> GGC GAC GTC GCG AAT
MUT331	110	アンチセンス	33	5'-ATT CGC GAC GTC GCC <u>CAT</u> GGC CAG GTC AGC ATC
MUT340	111	センス	33	5'-CTG ACA AAT ATG ATT <u>CAG</u> GAT GCC GGC GAT CTG
MUT341	112	アンチセンス	33	5'-CAG ATC GCC GGC ATC <u>CTG</u> AAT CAT ATT TGT CAG
MUT400	113	センス	33	5'-TCC GGC CAT ACC TCT <u>GCT</u> GGT TGG GCA TCC GCG
MUT401	114	アンチセンス	33	5'-CGC GGA TGC CCA ACC <u>AGC</u> AGA GGT ATG GCC GGA
MUT500	115	センス	33	5'-TCC GGC CAT ACC TCT <u>GGC</u> GGT TGG GCA TCC GCG
MUT501	116	アンチセンス	33	5'-CGC GGA TGC CCA ACC <u>GCC</u> AGA GGT ATG GCC GGA
MUT510	117	センス	33	5'-GAT GCT GAC CTG GCC <u>GAA</u> GGC GAC GTC GCG AAT
MUT511	118	アンチセンス	33	5'-ATT CGC GAC GTC GCC <u>TTC</u> GGC CAG GTC AGC ATC
MUT520	119	センス	33	5'-GAT GCT GAC CTG GCC <u>AAA</u> GGC GAC GTC GCG AAT
MUT521	120	アンチセンス	33	5'-ATT CGC GAC GTC GCC <u>TTT</u> GGC CAG GTC AGC ATC

表 1 3

プラスミド名	変異を導入したプラスミド	変異導入に用いたプライマー	変異点およびアミノ酸置換
pENP180			61L(CTG) → Q(CAG) 63A(GCT) → Q(CAG) 64E(GAA) → A(GCA) 67N(AAC) → D(GAC) 69S(AGC) → A(GCC) 72G(GGC) → D(GAC) 133T(ACC) → K(AAA) 134E(GAG) → D(GAC) 151I(ATC) → T(ACC)
pENP200	pENP130	MUT180, MUT181	61L(CTG) → Q(CAG) 63A(GCT) → Q(CAG) 64E(GAA) → A(GCA) 67N(AAC) → D(GAC) 69S(AGC) → A(GCC) 72G(GGC) → D(GAC) 133T(ACC) → K(AAA) 134E(GAG) → D(GAC) 151T(ACC) → S(TCC)
pENP300	pENP200	MUT300, MUT301	61L(CTG) → Q(CAG) 63A(GCT) → Q(CAG) 64E(GAA) → A(GCA) 67N(AAC) → D(GAC) 69S(AGC) → A(GCC) 72G(GGC) → D(GAC) 133T(ACC) → K(AAA) 134E(GAG) → D(GAC) 151I(ATC) → T(ACC) 149T(ACC) → S(TCC) 151T(ACC) → S(TCC)
pENP310	pENP300	MUT310, MUT311	61L(CTG) → Q(CAG) 63A(GCT) → Q(CAG) 64E(GAA) → A(GCA) 67N(AAC) → D(GAC) 69S(AGC) → A(GCC) 70A(GCC) → V(GTT) 72G(GGC) → D(GAC) 133T(ACC) → K(AAA) 134E(GAG) → D(GAC) 151I(ATC) → T(ACC) 149T(ACC) → S(TCC) 151T(ACC) → S(TCC)

表 1 3 続き (1)

プラスミド名	変異を導入したプラスミド	変異導入に用いたプライマー	変異点およびアミノ酸置換
pENP320	pENP310	MUT320, MUT321	61L(CTG) → Q(CAG) 63A(GCT) → Q(CAG) 64E(GAA) → A(GCA) 67N(AAC) → D(GAC) 69S(AGC) → A(GCC) 70A(GCC) → V(GTT) 72G(GGC) → D(GAC) 102E(GAG) → L(CTG) 133T(ACC) → K(AAA) 134E(GAG) → D(GAC) 149T(ACC) → S(TCC) 151T(ACC) → S(TCC)
pENP330	pENP300	MUT330, MUT331	61L(CTG) → Q(CAG) 63A(GCT) → Q(CAG) 64E(GAA) → A(GCA) 67N(AAC) → D(GAC) 69S(AGC) → A(GCC) 70A(GCC) → M(ATG) 72G(GGC) → D(GAC) 133T(ACC) → K(AAA) 134E(GAG) → D(GAC) 149T(ACC) → S(TCC) 151T(ACC) → S(TCC)
pENP340	pENP330	MUT340, MUT341	61L(CTG) → Q(CAG) 63A(GCT) → Q(CAG) 64E(GAA) → A(GCA) 67N(AAC) → D(GAC) 69S(AGC) → A(GCC) 70A(GCC) → V(GTT) 72G(GGC) → D(GAC) 102E(GAG) → Q(CAG) 133T(ACC) → K(AAA) 134E(GAG) → D(GAC) 149T(ACC) → S(TCC) 151T(ACC) → S(TCC)
pENP400	pENP200	MUT400, MUT401	61L(CTG) → Q(CAG) 63A(GCT) → Q(CAG) 64E(GAA) → A(GCA) 67N(AAC) → D(GAC) 69S(AGC) → A(GCC) 72G(GGC) → D(GAC) 133T(ACC) → K(AAA) 134E(GAG) → D(GAC) 149T(ACC) → A(GCT) 151T(ACC) → S(TCC)

表 1 3 続き (2)

プラスミド名	変異を導入したプラスミド	変異導入に用いたプライマー	変異点およびアミノ酸置換
pENP410	pENP400	MUT310, MUT311	61L(CTG) → Q(CAG) 63A(GCT) → Q(CAG) 64E(GAA) → A(GCA) 67N(AAC) → D(GAC) 69S(AGC) → A(GCC) 70A(GCC) → V(GTT) 72G(GGC) → D(GAC) 133T(ACC) → K(AAA) 134E(GAG) → D(GAC) 149T(ACC) → A(GCT) 151T(ACC) → S(TCC)
pENP500	pENP200	MUT500, MUT501	61L(CTG) → Q(CAG) 63A(GCT) → Q(CAG) 64E(GAA) → A(GCA) 67N(AAC) → D(GAC) 69S(AGC) → A(GCC) 72G(GGC) → D(GAC) 133T(ACC) → K(AAA) 134E(GAG) → D(GAC) 149T(ACC) → G(GGC) 151T(ACC) → S(TCC)
pENP510	pENP500	MUT510, MUT511	61L(CTG) → Q(CAG) 63A(GCT) → Q(CAG) 64E(GAA) → A(GCA) 67N(AAC) → D(GAC) 69S(AGC) → A(GCC) 70A(GCC) → E(GAA) 72G(GGC) → D(GAC) 133T(ACC) → K(AAA) 134E(GAG) → D(GAC) 149T(ACC) → G(GGC) 151T(ACC) → S(TCC)
pENP520	pENP500	MUT520, MUT521	61L(CTG) → Q(CAG) 63A(GCT) → Q(CAG) 64E(GAA) → A(GCA) 67N(AAC) → D(GAC) 69S(AGC) → A(GCC) 70A(GCC) → K(AAA) 72G(GGC) → D(GAC) 133T(ACC) → K(AAA) 134E(GAG) → D(GAC) 149T(ACC) → G(GGC) 151T(ACC) → S(TCC)

表 1 4

	イノシンに 対するKm値 (mM)	イノシンを 基質とした場 合の相対活性	グアノシンに 対するKm値 (mM)	グアノシンを 基質とした時 の相対活性
pENP180	4 0	1 . 0	4 0	1 . 0
pENP320	1 9	1 . 9	4 . 6	1 . 5
pENP340	1 9	1 . 4	5 . 1	1 . 3
pENP410	1 8	1 . 0	4 . 9	0 . 7 0
pENP510	1 7	0 . 5 5	4 . 0	0 . 3 9
pENP520	4 6	0 . 6 3	4 . 4	0 . 2 1

実施例 2 3 グアノシンに対する親和性の向上したエンテロバクター・アエロゲ
ネス IF0 12010 由来新規変異型酸性ホスファターゼ遺伝子導入菌によるグアノ
シンのリン酸化反応

それぞれの変異型酸性ホスファターゼ遺伝子を含むプラスミドを導入したエシェリヒア・コリ JM109/pENP180、エシェリヒア・コリJM109/pENP320、エシェリヒア・コリJM109/pENP340、エシェリヒア・コリJM109/pENP410、エシェリヒア・コリJM109/pENP510、およびエシェリヒア・コリJM109/pENP520をアンピシリン100 μ g/mlおよびIPTG 1mMを含むL培地50mlに接種し、37℃で16時間培養した。

ピロリン酸10g/dl、およびグアノシン結晶を水中でスラリーとし、粉碎機（スイスWAB社製DYN0-MILL）により結晶の粉碎処理を行ったグアノシン6.6g/dlを、100mM酢酸バッファー（pH4.5）に溶解し、これにそれぞれの菌体を乾燥菌体重量で100mg/dlとなるように添加し、pHを4.5に維持しながら、35℃で12時間反応させた。生成した5'-グアニル酸の量を表 1 5 に示した。表に示すように変異型酵素を導入した菌はいずれも親株であるエシェリヒア・コリ JM109/pENP180に比べて生産性が向上し、高い収率で5'-グアニル酸を生成蓄積した。

表 1 5

菌 株	生成 5'-グアニル酸 (g/dl)
エシェリヒア・コリ JM109/pENP180	9 . 9 0
エシェリヒア・コリ JM109/pENP320	1 0 . 4
エシェリヒア・コリ JM109/pENP340	1 0 . 2
エシェリヒア・コリ JM109/pENP410	1 1 . 1
エシェリヒア・コリ JM109/pENP510	1 1 . 0
エシェリヒア・コリ JM109/pENP520	1 0 . 5

産業上の利用可能性

以上詳細に説明したように、本発明によれば、ヌクレオシド-5'-リン酸生産能が向上した変異型ヌクレオシド-5'-リン酸生産酵素、及びその製造方法が提供される。また、本発明によれば、ヌクレオシド-5'-リン酸の製造方法に有用な、前記の変異型酵素をコードする遺伝子、該遺伝子を含む組換えDNA、該組換えDNAを保有する微生物が提供される。

更に、X線結晶構造解析技術によりタンパク質の新規立体構造の解明に成功した。

本発明の変異型ヌクレオシド-5'-リン酸生産酵素は、調味料、医薬並びにそれらの原料として有用なヌクレオシド-5'-リン酸の製造に利用することができる。

請求の範囲

1. ヌクレオシド-5'-リン酸生産酵素において、Lys残基1つ、Arg残基2つ、His残基2つが存在し、これらのC α 間距離が図1に示す範囲内にあり、かつその付近にヌクレオシドが結合するスペースを有する、リン酸基転移活性及び／又はホスファターゼ活性を有する酵素を改変して得られる、ヌクレオシド-5'-リン酸生産能が向上した変異型ヌクレオシド-5'-リン酸生産酵素。

2. 前記Lys残基、2つのArg残基、及び2つのHis残基のC α 間距離が図1に示す範囲内にある請求項1記載の変異型ヌクレオシド-5'-リン酸生産酵素。

3. エシェリヒア・ブラッタエ由来酸性ホスファターゼの結晶をX線結晶構造解析して得られる原子座標データに示されている構造座標を元にして、イノシン、グアノシン等のヌクレオシド並びにそのリン酸化合物との結合様式を推定し、アミノ酸残基及び／又は補欠因子等の置換、追加、削除によりヌクレオシド-5'-リン酸生産能が向上した請求項1記載の変異型ヌクレオシド-5'-リン酸生産酵素。

4. 酵素の由来がエシェリヒア属細菌、モルガネラ属細菌、プロビデンシア属細菌、エンテロバクター属細菌、又はクレブジエラ属細菌である請求項1記載の変異型酸性ホスファターゼ。

5. エシェリヒア・ブラッタエ由来酸性ホスファターゼのアミノ酸配列の以下の位置（エシェリヒア・ブラッタエ酸性ホスファターゼのSer72、又はSer72から10Å以内にある残基）：16、67-76、78-79、96、99-100、102-104、106-108、149-154、157、179、183の少なくとも一つの位置に変化が生じており、ヌクレオシド-5'-リン酸生産能が向上した変異型ヌクレオシド-5'-リン酸生産酵素。

6. リン酸基転移活性及び／又はホスファターゼ活性を有する酵素であって、エシェリヒア・ブラッタエ由来酸性ホスファターゼとのアミノ酸配列アラインメ

ントをしたときに、エシェリヒア・ブラッタエ由来酸性ホスファターゼのアミノ酸配列の以下の位置（エシェリヒア・ブラッタエ酸性ホスファターゼのSer 72、又はSer 72から10 Å以内にある残基）：16、67-76、78-79、96、99-100、102-104、106-108、149-154、157、179、183に対応する少なくとも一つの位置に変化が生じており、ヌクレオシド-5'-リン酸生産能が向上した変異型ヌクレオシド-5'-リン酸生産酵素。

7. リン酸基転移活性及び／又はホスファターゼ活性を有する酵素であって、エシェリヒア・ブラッタエ由来酸性ホスファターゼの3次元構造とのアラインメントをトレディング法により行ったときに、エシェリヒア・ブラッタエ由来酸性ホスファターゼのアミノ酸配列の以下の位置（エシェリヒア・ブラッタエ酸性ホスファターゼのSer 72、又はSer 72から10 Å以内にある残基）：16、67-76、78-79、96、99-100、102-104、106-108、149-154、157、179、183に対応する少なくとも一つの位置に変化が生じており、ヌクレオシド-5'-リン酸生産能が向上した変異型ヌクレオシド-5'-リン酸生産酵素。

8. さらに、前記の位置（エシェリヒア・ブラッタエ酸性ホスファターゼのSer 72、又はSer 72から10 Å以内にある残基）以外の少なくとも一つの位置に変化を生じさせることによって、前記リン酸基転移活性及び／又はホスファターゼ活性を有する酵素の野生型よりもリン酸基転移活性が高い他種生物由来の酵素の立体構造に近づけた請求項6記載の変異型ヌクレオシド-5'-リン酸生産酵素。

9. エシェリヒア・ブラッタエ由来酸性ホスファターゼのアミノ酸配列の以下の位置：16、71、72、73、103、104、140、151、153の少なくとも一つの位置に変化が生じており、ヌクレオシド-5'-リン酸生産能が向上した変異型ヌクレオシド-5'-リン酸生産酵素。

10. リン酸基転移活性及び／又はホスファターゼ活性を有する酵素であって、

エシェリヒア・ブラッタエ由来酸性ホスファターゼとのアミノ酸配列アラインメントをしたときに、エシェリヒア・ブラッタエ由来酸性ホスファターゼのアミノ酸配列の以下の位置：16、71、72、73、103、104、140、151、153に対応する少なくとも一つの位置に変化が生じており、ヌクレオシド-5'-リン酸生産能が向上した変異型ヌクレオシド-5'-リン酸生産酵素。

11. リン酸基転移活性及び／又はホスファターゼ活性を有する酵素であって、エシェリヒア・ブラッタエ由来酸性ホスファターゼとの3次元構造とのアラインメントをトレディング法により行ったときに、エシェリヒア・ブラッタエ由来酸性ホスファターゼのアミノ酸配列の以下の位置：16、71、72、73、103、104、140、151、153に対応する少なくとも一つの位置に変化が生じており、ヌクレオシド-5'-リン酸生産能が向上した変異型ヌクレオシド-5'-リン酸生産酵素。

12. エシェリヒア・ブラッタエ由来酸性ホスファターゼのアミノ酸配列の72番目の残基が、他のアミノ酸で置換された変異型ヌクレオシド-5'-リン酸生産酵素。

13. リン酸基転移活性及び／又はホスファターゼ活性を有する酵素であって、エシェリヒア・ブラッタエ由来酸性ホスファターゼとのアミノ酸配列アラインメントをしたときに、エシェリヒア・ブラッタエ由来酸性ホスファターゼのアミノ酸配列の72番目に対応する残基が他のアミノ酸で置換された変異型ヌクレオシド-5'-リン酸生産酵素。

14. リン酸基転移活性及び／又はホスファターゼ活性を有する酵素であって、エシェリヒア・ブラッタエ由来酸性ホスファターゼの3次元構造とのアラインメントをトレディング法により行ったときに、エシェリヒア・ブラッタエ由来酸性ホスファターゼのアミノ酸配列の72番目に対応する残基が、他のアミノ酸で置換された変異型ヌクレオシド-5'-リン酸生産酵素。

15. 酵素の由来がエンテロバクター・アエロゲネス由来であり、そのアミノ

酸配列において14番目のロイシン残基、61番目のロイシン残基、63番目のアラニン残基、64番目のグルタミン酸残基、67番目のアスパラギン残基、69番目のセリン残基、70番目のアラニン残基、71番目のグリシン残基、72番目のグリシン残基、101番目のイソロイシン残基、102番目のグルタミン酸残基、133番目のスレオニン残基、134番目のグルタミン酸残基、138番目のロイシン残基、149番目のスレオニン残基、151番目のイソロイシン残基のうち少なくとも一つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたものである請求項10記載の変異型酸性ホスファターゼ。

16. 酵素の由来がエンテロバクター・アエロゲネス由来であり、以下のいずれかのアミノ酸残基の置換を有する請求項12記載の変異型酸性ホスファターゼ。

(a) 61番目のロイシン残基がグルタミン残基に、63番目のアラニン残基がグルタミン残基に、64番目のグルタミン酸残基がアラニン残基に、67番目のアスパラギン残基がアスパラギン酸残基に、69番目のセリン残基がアラニン残基に、70番目のアラニン残基がバリン残基に、72番目のグリシン残基がアスパラギン酸残基に、102番目のグルタミン酸残基がロイシン残基に、133番目のスレオニン残基がリジン残基に、134番目のグルタミン酸残基がアスパラギン酸残基に、149番目のスレオニン残基がセリン残基に、151番目のイソロイシン残基がセリン残基にそれぞれ置換する変異。

(b) 61番目のロイシン残基がグルタミン残基に、63番目のアラニン残基がグルタミン残基に、64番目のグルタミン酸残基がアラニン残基に、67番目のアスパラギン残基がアスパラギン酸残基に、69番目のセリン残基がアラニン残基に、70番目のアラニン残基がバリン残基に、72番目のグリシン残基がアスパラギン酸残基に、133番目のスレオニン残基がリジン残基に、134番目のグルタミン酸残基がアスパラギン酸残基に、149番目のスレオニン残基がアラニン残基に、151番目のイソロイシン残基がセリン残基にそれぞれ置換する変異。

(c) 61番目のロイシン残基がグルタミン残基に、63番目のアラニン残基がグルタミン残基に、64番目のグルタミン酸残基がアラニン残基に、67番目のアスパラギン残基がアスパラギン酸残基に、69番目のセリン残基がアラニ

ン残基に、70番目のアラニン残基がグルタミン酸残基に、72番目のグリシン残基がアスパラギン酸残基に、133番目のスレオニン残基がリジン残基に、134番目のグルタミン酸残基がアスパラギン酸残基に、149番目のスレオニン残基がグリシン残基に、151番目のイソロイシン残基がセリン残基にそれぞれ置換する変異。

(d) 61番目のロイシン残基がグルタミン残基に、63番目のアラニン残基がグルタミン残基に、64番目のグルタミン酸残基がアラニン残基に、67番目のアスパラギン残基がアスパラギン酸残基に、69番目のセリン残基がアラニン残基に、70番目のアラニン残基がリジン残基に、72番目のグリシン残基がアスパラギン酸残基に、133番目のスレオニン残基がリジン残基に、134番目のグルタミン酸残基がアスパラギン酸残基に、149番目のスレオニン残基がグリシン残基に、151番目のイソロイシン残基がセリン残基にそれぞれ置換する変異。

(e) 61番目のロイシン残基がグルタミン残基に、63番目のアラニン残基がグルタミン残基に、64番目のグルタミン酸残基がアラニン残基に、67番目のアスパラギン残基がアスパラギン酸残基に、69番目のセリン残基がアラニン残基に、70番目のアラニン残基がメチオニン残基に、72番目のグリシン残基がアスパラギン酸残基に、102番目のグルタミン酸残基がグルタミン残基に、133番目のスレオニン残基がリジン残基に、134番目のグルタミン酸残基がアスパラギン酸残基に、149番目のスレオニン残基がセリン残基に、151番目のイソロイシン残基がセリン残基にそれぞれ置換する変異。

17. リン酸基転移活性及び／又はホスファターゼ活性を有する酵素、あるいはそれとモリブデン酸との複合体の結晶をX線結晶構造解析して得られる立体構造から確定された、該酵素の活性部位、及び／又はそれから10 Å以内にあるアミノ酸残基を、置換、追加、削除をすることにより、ヌクレオシド-5'-リン酸生産能が向上した変異型酵素を製造することを特徴とする変異型ヌクレオシド-5'-リン酸生産酵素の製造方法。

18. エシェリヒア・ブラッタエ由来酸性ホスファターゼの構造座標を使用し

て、ホスファターゼ又はリン酸基転移酵素の阻害剤を製造する方法。

19. リン酸基転移活性及び／又はホスファターゼ活性を有する酵素、あるいはそれとモリブデン酸との複合体のいずれかの結晶。

20. 六方晶系の空間群 $P6_322$ を有する、エシェリヒア・ブラッタエ由来酸性ホスファターゼの結晶。

21. 斜方晶系の空間群 $P2_12_12_1$ を有する、エシェリヒア・ブラッタエ由来酸性ホスファターゼ G74D / I153T 変異型酵素の結晶。

22. 三方晶系の空間群 $P3_121$ を有する、エシェリヒア・ブラッタエ由来酸性ホスファターゼとモリブデン酸との複合体（反応中間体アナログ）の結晶。

23. 請求項 1～16 のいずれか 1 項に記載の酵素をコードする遺伝子。

24. 請求項 23 に記載の遺伝子を含む組換え DNA。

25. 請求項 23 に記載の遺伝子又は請求項 24 に記載の組換え DNA が導入された微生物。

26. 請求項 1～16 のいずれか 1 項に記載の酵素、若しくはそれを含有する微生物、又は請求項 25 に記載の微生物を、ヌクレオシド並びにリン酸供与体に作用させてヌクレオシド-5'-リン酸を生成させ、これを採取することを特徴とするヌクレオシド-5'-リン酸の製造方法。

27. 前記酵素、若しくはそれを含有する微生物、又は請求項 25 に記載の微生物を、pH 3.0～5.5 の条件下でヌクレオシド並びにリン酸供与体に作用させることを特徴とする請求項 26 記載の方法。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

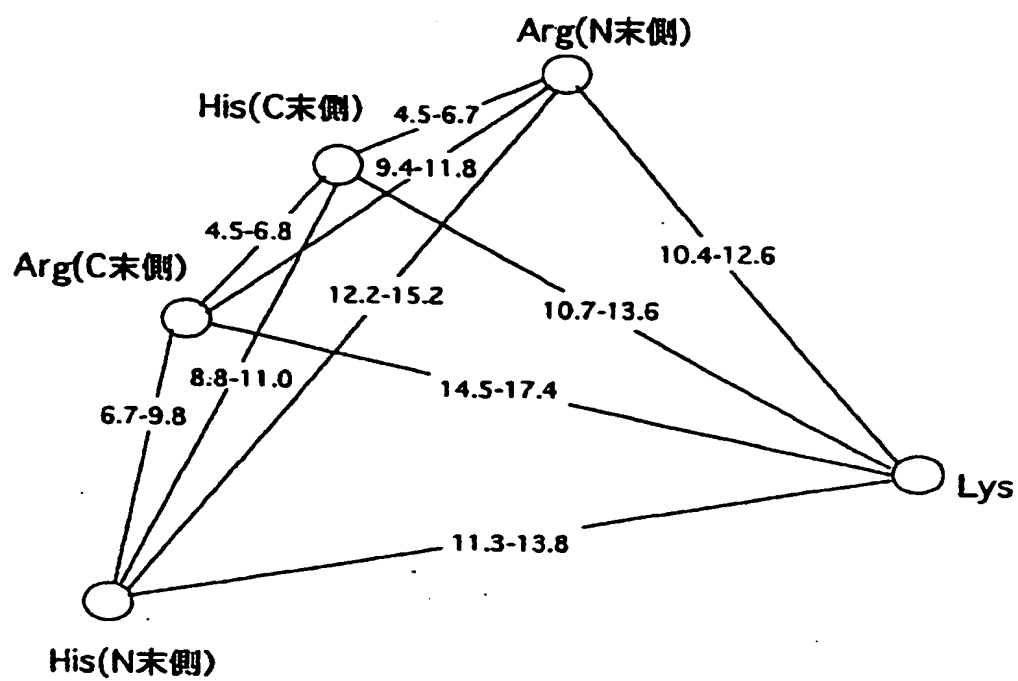


FIG. 1

THIS PAGE BLANK (uspro)

2 / 4 7

	$\alpha 1$	$\alpha 2$	$\alpha 3$
<i>E. blattae</i>	██████████	██████████	██████████
<i>M. morganii</i>	:LALVATGNDT TTKPDLVYLK NSEAINSLAL LPPPPAVGSI AFLNDQAMYE QGRLLRNTER GKLAATEDANL 70		
<i>S. typhimurium</i>	: AIPAGNDA TTKPDLVYLK NEQAIDSLKL LPPPEVGSI QFLNDQAMYE KGRMLRNTER GKQAAQADADL		
<i>Z. mobilis</i>	: KYT SAETVQPFHS PEESVNSQFY LPPPPGNDPP AYRYDKEAYF KGYAILGSPR WKQAAEADADV		
	: ASGLSQSVSA HTEKSEPSST YHFHSDPLLY LAPPFTSGSP LQAHDDQTFN STRQLKGSTR WALATQDADL * **		
	$\alpha 4$	$\alpha 5$	$\alpha 6$
<i>E. blattae</i>	██████████	██████████	██████████
<i>M. morganii</i>	:SSGVANAFS GAFGSPITEK DAPALHKLLT NMIEDAGDLA TRSAKDHVYR IRPFIFYGVS TCNTTEQDKL 140		
<i>S. typhimurium</i>	:AAGGVATAFS GAFGYPITEK DSPELYKLLT NMIEDAGDLA TRSAKDHVYR IRPFIFYGTE TCNTKDQKKL		
<i>Z. mobilis</i>	:SVENIARIFS PVVGAKINPK DTPETWNMLK NLLTMGGYYA TASA KVMR IRPFVLFNHS TCRPEDENTL		
	:HLASVLKDYA CAAGNLDIA QLPHLANLIK RALRTEYDDI GR-ARNNNR KRBFVDYDQP ICTEKDREGL * **		
	$\alpha 7$	$\alpha 8$	$\alpha 9$
	$\alpha 10$	$\alpha 11$	$\alpha 12$
<i>E. blattae</i>	██████████	██████████	██████████
<i>M. morganii</i>	:SKNGSYPSGH TSIGWATALV LAEINPQRON EILKRGVELG QSRVIGCYHW QSDVDAARV GSAVATLHT 210		
<i>S. typhimurium</i>	:STNGSYPSGH TSIGWATALV LAEVPANQD AILERGQQLG QSRVIGCYHW QSDVDAARIV GSAAVATLHS		
<i>Z. mobilis</i>	:RKNGSYPSGH TAYGTLALV LSEARPERAQ ELARRGWEFG QSRVIGCYHW QSDVDAARIV GSAVATLHT		
	:GKQGSYPSGH TTIGWSVALI LAELIPDHAA NILQRGQIFG TSRVIGCYHW QSDVDAARIV GSAVATLHT * *		
	*****	**	**
	$\alpha 13$		
<i>E. blattae</i>	██████████		
<i>M. morganii</i>	:NPAFQQQLQK AKAEFAQHQK K		
<i>S. typhimurium</i>	:DPAFQAQLAK AKQEAQKSQ K		
<i>Z. mobilis</i>	:IPAFQKSLAK VREELNDKNN LLSKEDHPKL NY		
	:DADFRDMEL ARKELEKART SAHTPDDLIC KIEQSAR *		

FIG. 2

THIS PAGE BLANK (USPTO)

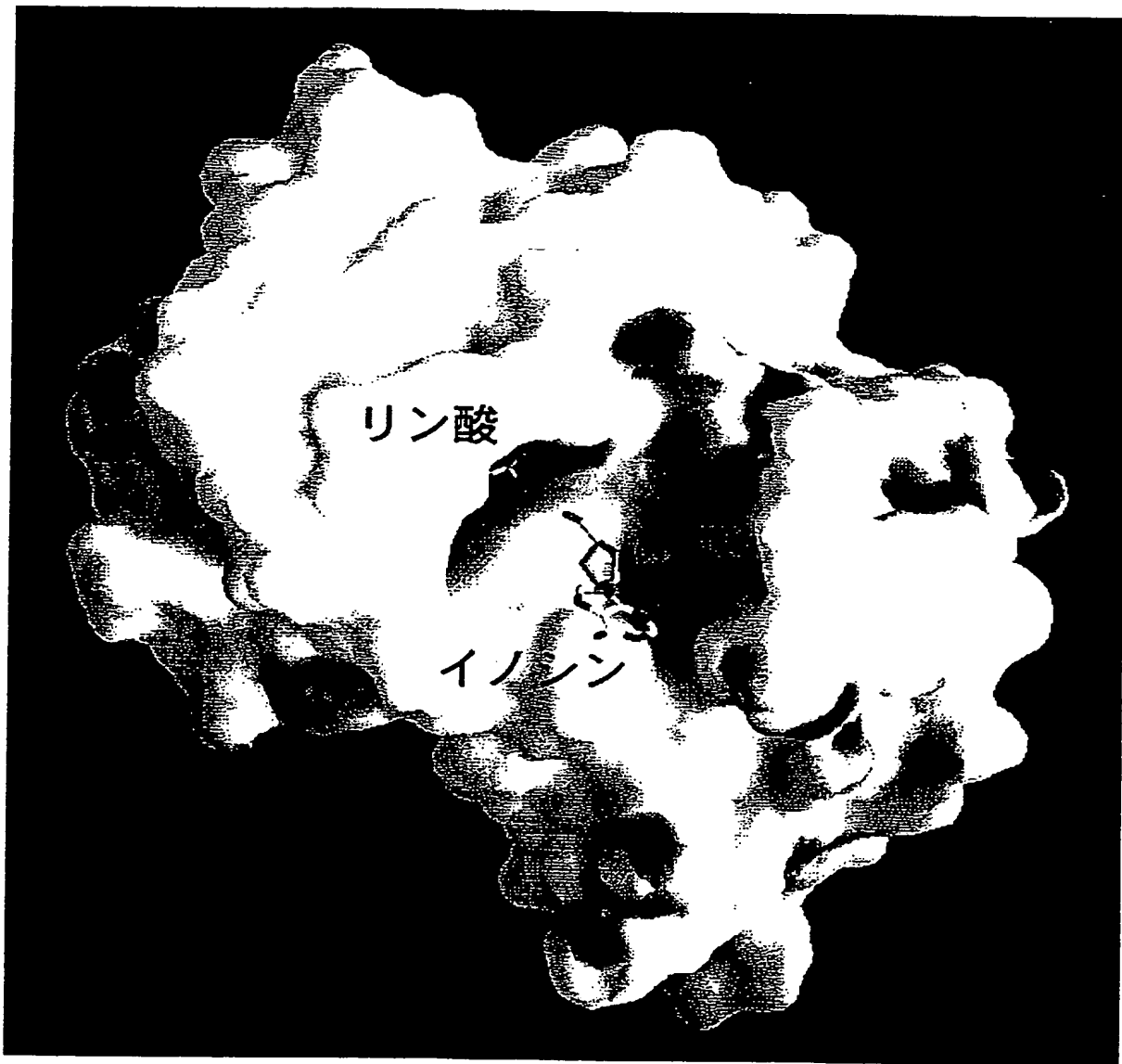


FIG. 3

THIS PAGE BLANK (USPTO)

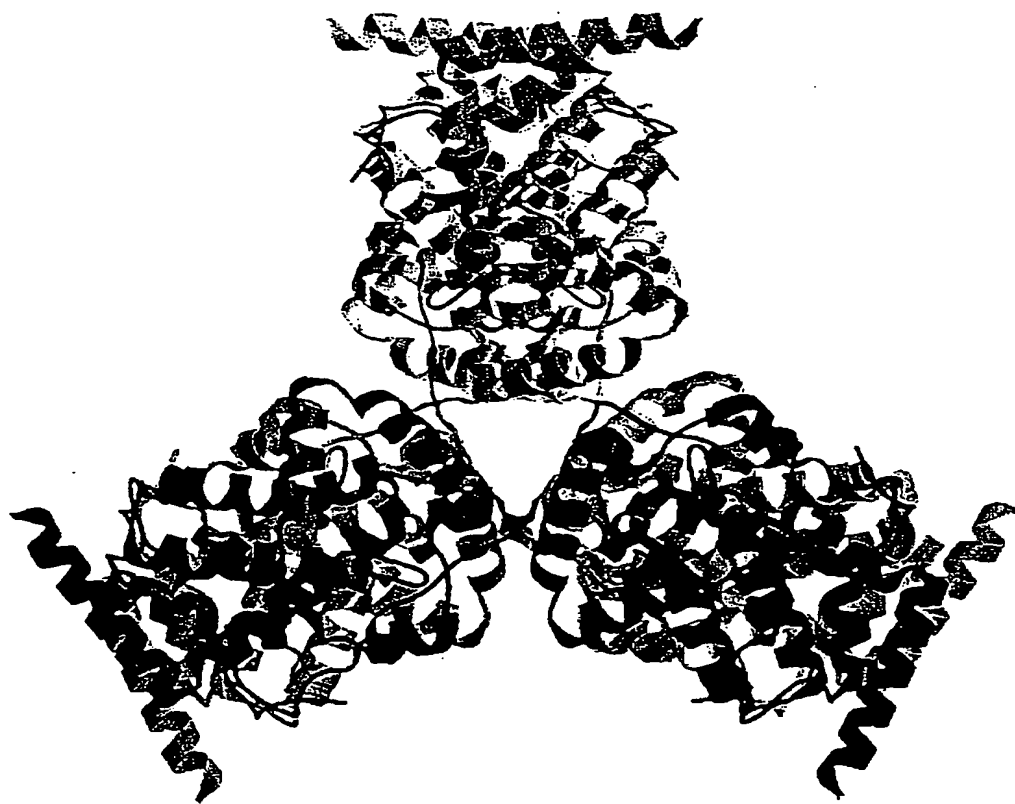


FIG. 4

THIS PAGE BLANK (uspro)

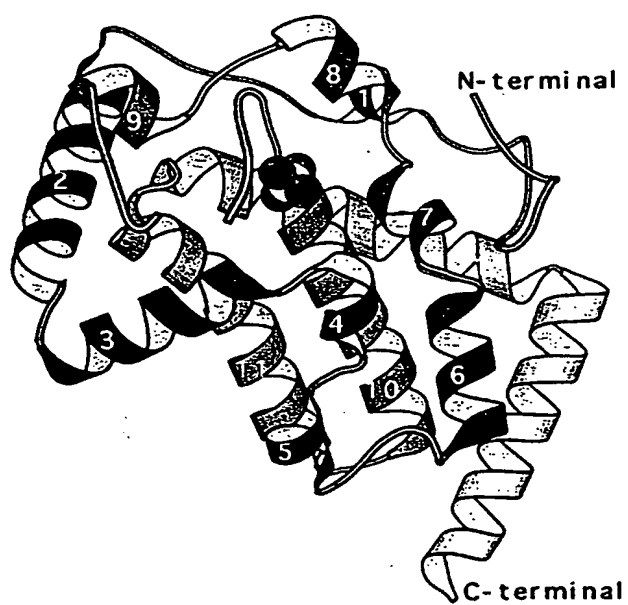


FIG. 5

THIS PAGE BLANK (uspto)

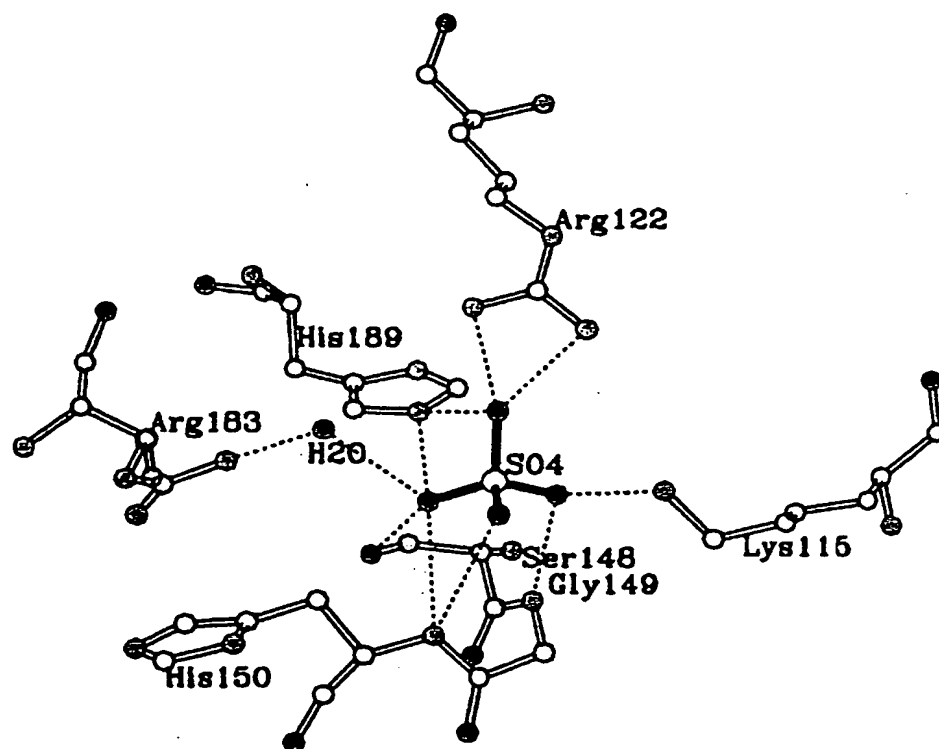


FIG. 6

THIS PAGE BLANK (uspto)

FIG. 7

S72F(s)	5'-CA-AAC-CTG-AGC-TTT-GGC-GAT-GTG-GC-3'	(SEQ ID NO:11)
S72F(as)	3'-GT-TTG-GAC-TCG-AAA-CCG-CTA-CAC-CG-5'	(SEQ ID NO:12)
	N L S F72 G D V	(SEQ ID NO:13)
S72Y(s)	5'-CA-AAC-CTG-AGC-TAC-GGC-GAT-GTG-GC-3'	(SEQ ID NO:14)
S72Y(as)	3'-GT-TTG-GAC-TCG-ATG-CCG-CTA-CAC-CG-5'	(SEQ ID NO:15)
	N L S Y72 G D V	(SEQ ID NO:16)
S72W(s)	5'-CA-AAC-CTG-AGC-TGG-GGC-GAT-GTG-GC-3'	(SEQ ID NO:17)
S72W(as)	3'-GT-TTG-GAC-TCG-ACC-CCG-CTA-CAC-CG-5'	(SEQ ID NO:18)
	N L S W72 G D V	(SEQ ID NO:19)
S72D(s)	5'-CA-AAC-CTG-AGC-GAC-GGC-GAT-GTG-GC-3'	(SEQ ID NO:20)
S72D(as)	3'-GT-TTG-GAC-TCG-CTG-CCG-CTA-CAC-CG-5'	(SEQ ID NO:21)
	N L S D72 G D V	(SEQ ID NO:22)
S72V(s)	5'-CA-AAC-CTG-AGC-GTT-GGC-GAT-GTG-GC-3'	(SEQ ID NO:23)
S72V(as)	3'-GT-TTG-GAC-TCG-CAA-CCG-CTA-CAC-CG-5'	(SEQ ID NO:24)
	N L S V72 G D V	(SEQ ID NO:25)
S72E(s)	5'-CA-AAC-CTG-AGC-GAA-GGC-GAT-GTG-GC-3'	(SEQ ID NO:26)
S72E(as)	3'-GT-TTG-GAC-TCG-CTT-CCG-CTA-CAC-CG-5'	(SEQ ID NO:27)
	N L S E72 G D V	(SEQ ID NO:28)
S72M(s)	5'-CA-AAC-CTG-AGC-ATG-GGC-GAT-GTG-GC-3'	(SEQ ID NO:29)
S72M(as)	3'-GT-TTG-GAC-TCG-TAC-CCG-CTA-CAC-CG-5'	(SEQ ID NO:30)
	N L S M72 G D V	(SEQ ID NO:31)
S72T(s)	5'-CA-AAC-CTG-AGC-ACC-GGC-GAT-GTG-GC-3'	(SEQ ID NO:32)
S72T(as)	3'-GT-TTG-GAC-TCG-TGG-CCG-CTA-CAC-CG-5'	(SEQ ID NO:33)
	N L S T72 G D V	(SEQ ID NO:34)
S72L(s)	5'-CA-AAC-CTG-AGC-CTG-GGC-GAT-GTG-GC-3'	(SEQ ID NO:35)
S72L(as)	3'-GT-TTG-GAC-TCG-GAC-CCG-CTA-CAC-CG-5'	(SEQ ID NO:36)
	N L S L72 G D V	(SEQ ID NO:37)
S72R(s)	5'-CA-AAC-CTG-AGC-CGT-GGC-GAT-GTG-GC-3'	(SEQ ID NO:38)
S72R(as)	3'-GT-TTG-GAC-TCG-GCA-CCG-CTA-CAC-CG-5'	(SEQ ID NO:39)
	N L S R72 G D V	(SEQ ID NO:40)
S72Q(s)	5'-CA-AAC-CTG-AGC-CAG-GGC-GAT-GTG-GC-3'	(SEQ ID NO:41)
S72Q(as)	3'-GT-TTG-GAC-TCG-GTC-CCG-CTA-CAC-CG-5'	(SEQ ID NO:42)
	N L S Q72 G D V	(SEQ ID NO:43)

THIS PAGE BLANK (uspto)

S72K(s)	5'-CA-AAC-CTG-AGC-AAA-GGC-GAT-GTG-GC-3'	(SEQ ID NO:44)
S72K(as)	3'-GT-TTG-GAC-TCG-TTT-CCG-CTA-CAC-CG-5'	(SEQ ID NO:45)
	N L S K72 G D V	(SEQ ID NO:46)
S72P(s)	5'-CA-AAC-CTG-AGC-CCG-GGC-GAT-GTG-GC-3'	(SEQ ID NO:47)
S72P(as)	3'-GT-TTG-GAC-TCG-GGC-CCG-CTA-CAC-CG-5'	(SEQ ID NO:48)
	N L S P72 G D V	(SEQ ID NO:49)
S72A(s)	5'-CA-AAC-CTG-AGC-GCG-GGC-GAT-GTG-GC-3'	(SEQ ID NO:50)
S72A(as)	3'-GT-TTG-GAC-TCG-CGC-CCG-CTA-CAC-CG-5'	(SEQ ID NO:51)
	N L S A72 G D V	(SEQ ID NO:52)
S72N(s)	5'-CA-AAC-CTG-AGC-AAC-GGC-GAT-GTG-GC-3'	(SEQ ID NO:53)
S72N(as)	3'-GT-TTG-GAC-TCG-TTG-CCG-CTA-CAC-CG-5'	(SEQ ID NO:54)
	N L S N72 G D V	(SEQ ID NO:55)
S72G(s)	5'-CA-AAC-CTG-AGC-GGT-GGC-GAT-GTG-GC-3'	(SEQ ID NO:56)
S72G(as)	3'-GT-TTG-GAC-TCG-CCA-CCG-CTA-CAC-CG-5'	(SEQ ID NO:57)
	N L S G72 G D V	(SEQ ID NO:58)
S72H(s)	5'-CA-AAC-CTG-AGC-CAC-GGC-GAT-GTG-GC-3'	(SEQ ID NO:59)
S72H(as)	3'-GT-TTG-GAC-TCG-GTG-CCG-CTA-CAC-CG-5'	(SEQ ID NO:60)
	N L S H72 G D V	(SEQ ID NO:61)

F I G. 7 (続き)

THIS PAGE BLANK (uspro)

L16W(s)	5'-CG-AAA-CCG-GAT-TGG-TAC-TAC-CTC-AA-3'	(SEQ ID NO:62)
L16W(as)	3'-GC-TTT-GGC-CTA-ACC-ATG-ATG-GAG-TT-5'	(SEQ ID NO:63)
	K P D W16 Y Y L	(SEQ ID NO:64)
S71W(s)	5'-AT-GCA-AAC-CTG-TGG-AGT-GGC-GAT-GT-3'	(SEQ ID NO:65)
S71W(as)	3'-TA-CGT-TTG-GAC-ACC-TCA-CCG-CTA-CA-5'	(SEQ ID NO:66)
	A N L W71 S G D	(SEQ ID NO:67)
S73W(s)	5'-AC-CTG-AGC-AGT-TGG-GAT-GTG-GCG-AA-3'	(SEQ ID NO:68)
S73W(as)	3'-TG-GAC-TCG-TCA-ACC-CTA-CAC-CGC-TT-5'	(SEQ ID NO:69)
	L S S W73 D V A	(SEQ ID NO:70)
E104F(s)	5'-CC-AAT-ATG-ATT-TTT-GAC-GCC-GGG-GA-3'	(SEQ ID NO:71)
E104F(as)	3'-GG-TTA-TAC-TAA-AAA-CTG-CGG-CCC-CT-5'	(SEQ ID NO:72)
	N M I F104 D A G	(SEQ ID NO:73)
E104W(s)	5'-CC-AAT-ATG-ATT-TGG-GAC-GCC-GGG-GA-3'	(SEQ ID NO:74)
E104W(as)	3'-GG-TTA-TAC-TAA-ACC-CTG-CGG-CCC-CT-5'	(SEQ ID NO:75)
	N M I W104 D A G	(SEQ ID NO:76)

FIG. 8A

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A72F(s)	5'	-CA-GAC-CTG-GCC-TTT-GGC-GAT-GTG-GC-3'	(SEQ ID NO:77)
A72F(as)	3'	-GT-CTG-GAC-CGG-AAA-CCG-CTA-CAC-CG-5'	(SEQ ID NO:78)
		D L A F72 G D V	(SEQ ID NO:79)
A72E(s)	5'	-CA-GAC-CTG-GCC-GAA-GGC-GAT-GTG-GC-3'	(SEQ ID NO:80)
A72E(as)	3'	-GT-CTG-GAC-CGG-CTT-CCG-CTA-CAC-CG-5'	(SEQ ID NO:81)
		D L A E72 G D V	(SEQ ID NO:82)

FIG. 8B

I103D(s)	5'	-TG-ACC-AAT-ATG-GAC-GAG-GAC-GCC-GG-3'	(SEQ ID NO:83)
I103D(as)	3'	-AC-TGG-TTA-TAC-CTG-CTC-CTG-CGG-CC-5'	(SEQ ID NO:84)
		T N M D103 E D A	(SEQ ID NO:85)
T153N(s)	5'	-GG-CAT-ACC-TCT-AAC-GGC-TGG-GCT-AC-3'	(SEQ ID NO:86)
T153N(as)	3'	-CC-GTA-TGG-AGA-TTG-CCG-ACC-CGA-TG-5'	(SEQ ID NO:87)
		H T S N153 G W A	(SEQ ID NO:88)

FIG. 8C

L140F(s)	5'	-AC-CAG-GAC-AAA-TTC-TCC-AAA-AAT-GG-3'	(SEQ ID NO:89)
L140F(as)	3'	-TG-GTC-CTG-TTT-AAG-AGG-TTT-TTA-CC-5'	(SEQ ID NO:90)
		Q D K F140 S K N	(SEQ ID NO:91)
L140K(s)	5'	-AC-CAG-GAC-AAA-AAA-TCC-AAA-AAT-GG-3'	(SEQ ID NO:92)
L140K(as)	3'	-TG-GTC-CTG-TTT-TTT-AGG-TTT-TTA-CC-5'	(SEQ ID NO:93)
		Q D K K140 S K N	(SEQ ID NO:94)
L140E(s)	5'	-AC-CAG-GAC-AAA-GAA-TCC-AAA-AAT-GG-3'	(SEQ ID NO:95)
L140E(as)	3'	-TG-GTC-CTG-TTT-CTT-AGG-TTT-TTA-CC-5'	(SEQ ID NO:96)
		Q D K E140 S K N	(SEQ ID NO:97)

FIG. 8D

THIS PAGE BLANK (USPTO)

1 1 / 4 7

EB-AP:	LALVATGNDTTTKPDLYYLKNSEAINSLALLPPPPAVGSIAFLNDQAMYEQGRLLRNTER
	V GND TTKPDLYYLKN++AI+SLALLPPPP VGSIAFLNDQAMYE+GRLLRNTER
EA-AP:	LVPAGNDATTKPDLYYLKNAQAIDSLALLPPPPEVGSIAFLNDQAMYEKGRLLRNTER
	[72]
EB-AP:	GKLAAEDANLSSGGVANAFSGAFGSPITEKDAPALHKLLTNMIEDAGDLATRSAKDHYMR
	GKLAAEDANLS+GGVANAFS AFGSPITEKDAP LHKLLTNMIEDAGDLATRSAK+ YMR
EA-AP:	GKLAAEDANLSAGGVANAFSSAFGSPITEKDAPQLHKLLTNMIEDAGDLATRSAKEKYMR
	[70]
EB-AP:	IRPFAFYGVSTCNTTEQDKLSKNGSYPSGHTSIGWATALVLAIEINPQRQNEILKRGYELG
	IRPFAFYGVSTCNTTEQDKLSKNGSYPSGHTSIGWATALVLAIEINPQRQNEILKRGYELG
EA-AP:	IRPFAFYGVSTCNTTEQDKLSKNGSYPSGHTSIGWATALVLAIEINPQRQNEILKRGYELG
EB-AP:	QSRVICGYHWQSDVDAAARVVGSAVVATLHTNPFAFQQQLQKAKAEFAQHOKK
	+SRVICGYHWQSDVDAAAR+VGSVVATLHTNPFAFQQQLQKAK EFA+ QK
EA-AP:	ESRVICGYHWQSDVDAAARIVGSVVATLHTNPFAFQQQLQKAKDEFKATQK

F I G. 9

THIS PAGE BLANK (USPTO)

F I G. 1 0

ATOM	1	N	GLY	A	7	35.965	71.208	89.712	1.00	36.57
ATOM	2	CA	GLY	A	7	37.459	71.295	89.574	1.00	31.92
ATOM	3	C	GLY	A	7	38.160	69.982	89.872	1.00	29.76
ATOM	4	O	GLY	A	7	39.301	69.858	89.492	1.00	31.81
ATOM	5	N	ASN	A	8	37.485	68.990	90.532	1.00	26.40
ATOM	6	CA	ASN	A	8	38.284	67.775	90.697	1.00	26.63
ATOM	7	C	ASN	A	8	38.466	67.018	89.396	1.00	29.21
ATOM	8	O	ASN	A	8	37.736	67.238	88.431	1.00	30.52
ATOM	9	CB	ASN	A	8	37.677	66.810	91.702	1.00	27.01
ATOM	10	CG	ASN	A	8	37.725	67.396	93.104	1.00	32.45
ATOM	11	OD1	ASN	A	8	38.751	67.744	93.636	1.00	30.02
ATOM	12	ND2	ASN	A	8	36.545	67.536	93.707	1.00	31.60
ATOM	13	N	ASP	A	9	39.455	66.154	89.463	1.00	29.14
ATOM	14	CA	ASP	A	9	39.787	65.216	88.391	1.00	30.47
ATOM	15	C	ASP	A	9	40.661	64.081	88.901	1.00	31.02
ATOM	16	O	ASP	A	9	40.804	63.931	90.110	1.00	31.00
ATOM	17	CB	ASP	A	9	40.394	65.960	87.195	1.00	30.92
ATOM	18	CG	ASP	A	9	41.802	66.484	87.429	1.00	32.66
ATOM	19	OD1	ASP	A	9	42.307	66.333	88.532	1.00	35.03
ATOM	20	OD2	ASP	A	9	42.400	67.018	86.493	1.00	31.63
ATOM	21	N	THR	A	10	41.272	63.298	87.998	1.00	28.72
ATOM	22	CA	THR	A	10	42.188	62.228	88.430	1.00	28.53
ATOM	23	C	THR	A	10	43.408	62.655	89.259	1.00	30.10
ATOM	24	O	THR	A	10	43.946	61.944	90.095	1.00	29.06
ATOM	25	CB	THR	A	10	42.692	61.405	87.235	1.00	26.05
ATOM	26	OG1	THR	A	10	43.272	60.172	87.655	1.00	27.75
ATOM	27	CG2	THR	A	10	43.670	62.174	86.313	1.00	23.76
ATOM	28	N	THR	A	11	43.814	63.900	88.996	1.00	30.82
ATOM	29	CA	THR	A	11	44.932	64.389	89.799	1.00	32.79
ATOM	30	C	THR	A	11	44.605	64.736	91.267	1.00	36.32
ATOM	31	O	THR	A	11	45.435	64.658	92.162	1.00	37.21
ATOM	32	CB	THR	A	11	45.588	65.591	89.143	1.00	30.53
ATOM	33	OG1	THR	A	11	44.845	66.781	89.359	1.00	27.79
ATOM	34	CG2	THR	A	11	45.899	65.362	87.656	1.00	32.16
ATOM	35	N	THR	A	12	43.317	65.076	91.495	1.00	34.81
ATOM	36	CA	THR	A	12	42.910	65.213	92.900	1.00	32.91
ATOM	37	C	THR	A	12	42.265	63.992	93.549	1.00	33.08
ATOM	38	O	THR	A	12	42.350	63.742	94.736	1.00	32.49
ATOM	39	CB	THR	A	12	41.963	66.395	93.077	1.00	30.92
ATOM	40	OG1	THR	A	12	40.719	66.162	92.409	1.00	32.04
ATOM	41	CG2	THR	A	12	42.599	67.667	92.543	1.00	29.75
ATOM	42	N	LYS	A	13	41.565	63.229	92.703	1.00	31.17
ATOM	43	CA	LYS	A	13	40.791	62.064	93.174	1.00	30.27
ATOM	44	C	LYS	A	13	40.904	60.812	92.287	1.00	31.40
ATOM	45	O	LYS	A	13	39.981	60.348	91.605	1.00	33.05
ATOM	46	CB	LYS	A	13	39.294	62.395	93.331	1.00	29.09
ATOM	47	CG	LYS	A	13	39.001	63.747	93.965	1.00	32.97
ATOM	48	CD	LYS	A	13	37.536	64.076	94.166	1.00	37.86
ATOM	49	CE	LYS	A	13	36.767	62.909	94.772	1.00	47.28
ATOM	50	NZ	LYS	A	13	35.340	63.270	94.947	1.00	52.08
ATOM	51	N	PRO	A	14	42.138	60.283	92.279	1.00	33.01
ATOM	52	CA	PRO	A	14	42.516	59.249	91.290	1.00	32.06
ATOM	53	C	PRO	A	14	41.823	57.907	91.452	1.00	30.98
ATOM	54	O	PRO	A	14	41.961	56.989	90.668	1.00	32.57

THIS PAGE BLANK (USPTO)

13 / 47

FIG. 11

ATOM	55	CB	PRO	A	14	44.035	59.145	91.458	1.00	34.46
ATOM	56	CG	PRO	A	14	44.283	59.564	92.920	1.00	33.02
ATOM	57	CD	PRO	A	14	43.225	60.638	93.181	1.00	34.46
ATOM	58	N	ASP	A	15	41.046	57.815	92.513	1.00	29.27
ATOM	59	CA	ASP	A	15	40.204	56.655	92.809	1.00	28.89
ATOM	60	C	ASP	A	15	38.810	56.684	92.146	1.00	21.76
ATOM	61	O	ASP	A	15	38.078	55.706	92.030	1.00	20.59
ATOM	62	CB	ASP	A	15	40.125	56.599	94.368	1.00	37.60
ATOM	63	CG	ASP	A	15	39.589	57.903	95.080	1.00	45.11
ATOM	64	OD1	ASP	A	15	40.062	59.044	94.817	1.00	45.67
ATOM	65	OD2	ASP	A	15	38.687	57.751	95.922	1.00	49.07
ATOM	66	N	LEU	A	16	38.495	57.910	91.726	1.00	20.49
ATOM	67	CA	LEU	A	16	37.182	58.179	91.135	1.00	23.90
ATOM	68	C	LEU	A	16	37.156	58.814	89.727	1.00	22.23
ATOM	69	O	LEU	A	16	36.109	59.011	89.134	1.00	23.21
ATOM	70	CB	LEU	A	16	36.354	59.099	92.029	1.00	23.35
ATOM	71	CG	LEU	A	16	35.814	58.432	93.297	1.00	25.48
ATOM	72	CD1	LEU	A	16	34.876	57.253	93.075	1.00	24.05
ATOM	73	CD2	LEU	A	16	35.092	59.477	94.104	1.00	25.22
ATOM	74	N	TYR	A	17	38.343	59.175	89.273	1.00	20.96
ATOM	75	CA	TYR	A	17	38.555	59.605	87.889	1.00	22.04
ATOM	76	C	TYR	A	17	39.780	58.903	87.334	1.00	22.80
ATOM	77	O	TYR	A	17	40.790	58.799	88.021	1.00	23.48
ATOM	78	CB	TYR	A	17	38.856	61.095	87.711	1.00	18.01
ATOM	79	CG	TYR	A	17	37.928	62.099	88.371	1.00	24.78
ATOM	80	CD1	TYR	A	17	37.129	62.916	87.542	1.00	22.78
ATOM	81	CD2	TYR	A	17	37.905	62.248	89.781	1.00	23.58
ATOM	82	CE1	TYR	A	17	36.317	63.919	88.113	1.00	26.51
ATOM	83	CE2	TYR	A	17	37.090	63.240	90.349	1.00	22.88
ATOM	84	CZ	TYR	A	17	36.303	64.059	89.517	1.00	24.63
ATOM	85	OH	TYR	A	17	35.482	65.023	90.066	1.00	22.92
ATOM	86	N	TYR	A	18	39.670	58.482	86.053	1.00	26.17
ATOM	87	CA	TYR	A	18	40.838	58.209	85.191	1.00	21.13
ATOM	88	C	TYR	A	18	41.332	59.414	84.464	1.00	19.92
ATOM	89	O	TYR	A	18	42.490	59.511	84.083	1.00	22.64
ATOM	90	CB	TYR	A	18	40.563	57.195	84.080	1.00	17.53
ATOM	91	CG	TYR	A	18	40.312	55.826	84.610	1.00	16.91
ATOM	92	CD1	TYR	A	18	41.425	55.028	84.916	1.00	19.86
ATOM	93	CD2	TYR	A	18	38.985	55.372	84.771	1.00	16.65
ATOM	94	CE1	TYR	A	18	41.218	53.725	85.383	1.00	18.64
ATOM	95	CE2	TYR	A	18	38.765	54.053	85.213	1.00	17.52
ATOM	96	CZ	TYR	A	18	39.892	53.262	85.515	1.00	21.18
ATOM	97	OH	TYR	A	18	39.734	51.974	85.977	1.00	26.15
ATOM	98	N	LEU	A	19	40.412	60.336	84.236	1.00	21.49
ATOM	99	CA	LEU	A	19	40.788	61.462	83.366	1.00	22.71
ATOM	100	C	LEU	A	19	41.094	62.812	84.021	1.00	25.01
ATOM	101	O	LEU	A	19	40.771	63.125	85.159	1.00	25.24
ATOM	102	CB	LEU	A	19	39.708	61.669	82.290	1.00	21.68
ATOM	103	CG	LEU	A	19	39.301	60.442	81.432	1.00	22.88
ATOM	104	CD1	LEU	A	19	40.430	59.842	80.583	1.00	20.39
ATOM	105	CD2	LEU	A	19	38.078	60.812	80.608	1.00	18.83
ATOM	106	N	LYS	A	20	41.736	63.667	83.246	1.00	26.44
ATOM	107	CA	LYS	A	20	41.947	65.032	83.717	1.00	26.77
ATOM	108	C	LYS	A	20	40.935	66.034	83.292	1.00	26.42

THIS PAGE BLANK (USPTO)

14 / 47

FIG. 12

ATOM	109	O	LYS	A	20	40.182	65.870	82.341	1.00	29.05
ATOM	110	CB	LYS	A	20	43.239	65.608	83.187	1.00	30.61
ATOM	111	CG	LYS	A	20	44.400	64.791	83.648	1.00	32.90
ATOM	112	CD	LYS	A	20	45.633	65.326	82.963	1.00	39.72
ATOM	113	CE	LYS	A	20	46.698	64.259	83.113	1.00	50.27
ATOM	114	NZ	LYS	A	20	46.148	62.977	82.610	1.00	62.00
ATOM	115	N	ASN	A	21	41.050	67.184	83.943	1.00	24.09
ATOM	116	CA	ASN	A	21	40.154	68.246	83.530	1.00	23.98
ATOM	117	C	ASN	A	21	40.177	68.539	82.032	1.00	25.08
ATOM	118	O	ASN	A	21	39.134	68.722	81.427	1.00	25.36
ATOM	119	CB	ASN	A	21	40.310	69.512	84.371	1.00	23.81
ATOM	120	CG	ASN	A	21	39.601	69.311	85.697	1.00	26.97
ATOM	121	OD1	ASN	A	21	38.392	69.175	85.836	1.00	26.36
ATOM	122	ND2	ASN	A	21	40.403	69.303	86.744	1.00	32.00
ATOM	123	N	SER	A	22	41.378	68.486	81.450	1.00	23.72
ATOM	124	CA	SER	A	22	41.592	68.804	80.008	1.00	25.53
ATOM	125	C	SER	A	22	40.992	67.752	79.068	1.00	25.77
ATOM	126	O	SER	A	22	40.524	68.007	77.966	1.00	27.65
ATOM	127	CB	SER	A	22	43.079	68.868	79.699	1.00	23.34
ATOM	128	OG	SER	A	22	43.719	67.716	80.303	1.00	33.30
ATOM	129	N	GLU	A	23	40.957	66.529	79.624	1.00	22.35
ATOM	130	CA	GLU	A	23	40.320	65.466	78.899	1.00	21.87
ATOM	131	C	GLU	A	23	38.811	65.375	78.974	1.00	23.18
ATOM	132	O	GLU	A	23	38.197	64.451	78.471	1.00	25.83
ATOM	133	CB	GLU	A	23	40.923	64.165	79.337	1.00	22.13
ATOM	134	CG	GLU	A	23	42.451	64.215	79.214	1.00	26.78
ATOM	135	CD	GLU	A	23	43.021	62.908	79.718	1.00	30.40
ATOM	136	OE1	GLU	A	23	42.946	62.648	80.900	1.00	31.10
ATOM	137	OE2	GLU	A	23	43.544	62.118	78.957	1.00	32.35
ATOM	138	N	ALA	A	24	38.196	66.359	79.610	1.00	21.49
ATOM	139	CA	ALA	A	24	36.751	66.165	79.738	1.00	22.48
ATOM	140	C	ALA	A	24	35.973	66.420	78.438	1.00	22.81
ATOM	141	O	ALA	A	24	36.325	67.333	77.704	1.00	23.36
ATOM	142	CB	ALA	A	24	36.188	67.183	80.734	1.00	21.43
ATOM	143	N	ILE	A	25	34.859	65.694	78.228	1.00	23.46
ATOM	144	CA	ILE	A	25	33.845	66.149	77.243	1.00	23.60
ATOM	145	C	ILE	A	25	33.312	67.535	77.530	1.00	24.71
ATOM	146	O	ILE	A	25	32.788	67.809	78.603	1.00	25.03
ATOM	147	CB	ILE	A	25	32.684	65.160	77.096	1.00	20.26
ATOM	148	CG1	ILE	A	25	33.237	63.749	76.838	1.00	23.14
ATOM	149	CG2	ILE	A	25	31.739	65.555	75.954	1.00	21.26
ATOM	150	CD1	ILE	A	25	34.298	63.551	75.722	1.00	16.94
ATOM	151	N	ASN	A	26	33.485	68.431	76.562	1.00	22.50
ATOM	152	CA	ASN	A	26	32.797	69.706	76.751	1.00	22.04
ATOM	153	C	ASN	A	26	31.295	69.680	76.533	1.00	22.52
ATOM	154	O	ASN	A	26	30.731	70.042	75.509	1.00	22.34
ATOM	155	CB	ASN	A	26	33.474	70.744	75.900	1.00	20.15
ATOM	156	CG	ASN	A	26	32.982	72.133	76.217	1.00	24.94
ATOM	157	OD1	ASN	A	26	31.923	72.459	76.732	1.00	29.46
ATOM	158	ND2	ASN	A	26	33.827	73.032	75.809	1.00	25.76
ATOM	159	N	SER	A	27	30.627	69.289	77.622	1.00	19.77
ATOM	160	CA	SER	A	27	29.166	69.168	77.549	1.00	18.88
ATOM	161	C	SER	A	27	28.412	70.423	77.177	1.00	18.74
ATOM	162	O	SER	A	27	27.390	70.393	76.517	1.00	21.73

THIS PAGE BLANK (USPTO)

15 / 47

FIG. 13

ATOM	163	CB	SER A	27	28.606	68.619	78.870	1.00	19.35
ATOM	164	OG	SER A	27	28.967	69.518	79.940	1.00	19.36
ATOM	165	N	LEU A	28	28.961	71.564	77.588	1.00	18.08
ATOM	166	CA	LEU A	28	28.271	72.815	77.262	1.00	20.15
ATOM	167	C	LEU A	28	28.283	73.062	75.761	1.00	23.12
ATOM	168	O	LEU A	28	27.303	73.485	75.165	1.00	22.25
ATOM	169	CB	LEU A	28	28.990	74.042	77.798	1.00	17.00
ATOM	170	CG	LEU A	28	28.159	75.188	78.376	1.00	18.01
ATOM	171	CD1	LEU A	28	26.847	75.547	77.733	1.00	14.28
ATOM	172	CD2	LEU A	28	29.053	76.394	78.592	1.00	16.45
ATOM	173	N	ALA A	29	29.478	72.767	75.193	1.00	23.87
ATOM	174	CA	ALA A	29	29.598	72.827	73.707	1.00	22.62
ATOM	175	C	ALA A	29	28.773	71.847	72.837	1.00	20.86
ATOM	176	O	ALA A	29	28.192	72.239	71.830	1.00	25.89
ATOM	177	CB	ALA A	29	31.065	72.692	73.326	1.00	20.24
ATOM	178	N	LEU A	30	28.733	70.580	73.267	1.00	15.78
ATOM	179	CA	LEU A	30	28.079	69.497	72.519	1.00	18.05
ATOM	180	C	LEU A	30	26.557	69.416	72.559	1.00	22.38
ATOM	181	O	LEU A	30	25.845	69.251	71.566	1.00	23.63
ATOM	182	CB	LEU A	30	28.732	68.194	72.977	1.00	16.47
ATOM	183	CG	LEU A	30	28.234	66.887	72.360	1.00	17.59
ATOM	184	CD1	LEU A	30	28.812	65.706	73.120	1.00	12.95
ATOM	185	CD2	LEU A	30	28.456	66.775	70.850	1.00	13.89
ATOM	186	N	LEU A	31	26.075	69.533	73.812	1.00	22.39
ATOM	187	CA	LEU A	31	24.633	69.430	74.049	1.00	18.84
ATOM	188	C	LEU A	31	23.817	70.624	73.538	1.00	16.30
ATOM	189	O	LEU A	31	24.260	71.763	73.576	1.00	19.93
ATOM	190	CB	LEU A	31	24.381	69.199	75.556	1.00	16.94
ATOM	191	CG	LEU A	31	24.923	67.873	76.095	1.00	17.95
ATOM	192	CD1	LEU A	31	24.177	66.669	75.553	1.00	11.60
ATOM	193	CD2	LEU A	31	24.823	67.878	77.628	1.00	18.77
ATOM	194	N	PRO A	32	22.581	70.333	73.105	1.00	14.80
ATOM	195	CA	PRO A	32	21.589	71.404	72.910	1.00	18.31
ATOM	196	C	PRO A	32	21.228	72.028	74.278	1.00	22.24
ATOM	197	O	PRO A	32	21.453	71.442	75.327	1.00	22.27
ATOM	198	CB	PRO A	32	20.402	70.621	72.348	1.00	15.94
ATOM	199	CG	PRO A	32	20.545	69.184	72.847	1.00	16.93
ATOM	200	CD	PRO A	32	22.038	68.972	72.954	1.00	15.56
ATOM	201	N	PRO A	33	20.657	73.249	74.287	1.00	23.41
ATOM	202	CA	PRO A	33	20.190	73.780	75.586	1.00	20.34
ATOM	203	C	PRO A	33	19.059	72.945	76.084	1.00	19.93
ATOM	204	O	PRO A	33	18.409	72.292	75.285	1.00	18.67
ATOM	205	CB	PRO A	33	19.659	75.158	75.224	1.00	18.52
ATOM	206	CG	PRO A	33	20.267	75.499	73.877	1.00	21.71
ATOM	207	CD	PRO A	33	20.406	74.146	73.177	1.00	21.12
ATOM	208	N	PRO A	34	18.785	72.950	77.411	1.00	19.36
ATOM	209	CA	PRO A	34	17.645	72.138	77.863	1.00	13.70
ATOM	210	C	PRO A	34	16.348	72.759	77.351	1.00	11.77
ATOM	211	O	PRO A	34	16.280	73.937	77.090	1.00	14.58
ATOM	212	CB	PRO A	34	17.760	72.358	79.389	1.00	13.66
ATOM	213	CG	PRO A	34	18.471	73.698	79.571	1.00	14.81
ATOM	214	CD	PRO A	34	19.499	73.679	78.464	1.00	16.49
ATOM	215	N	PRO A	35	15.257	72.007	77.284	1.00	12.52
ATOM	216	CA	PRO A	35	14.011	72.710	76.973	1.00	13.71

THIS PAGE BLANK (USPTO)

FIG. 14

ATOM	217	C	PRO A	35	13.665	73.842	77.945	1.00	20.26
ATOM	218	O	PRO A	35	13.728	73.715	79.159	1.00	20.52
ATOM	219	CB	PRO A	35	12.997	71.579	76.991	1.00	11.74
ATOM	220	CG	PRO A	35	13.723	70.243	77.051	1.00	12.04
ATOM	221	CD	PRO A	35	15.140	70.581	77.482	1.00	11.57
ATOM	222	N	ALA A	36	13.311	74.962	77.356	1.00	19.25
ATOM	223	CA	ALA A	36	12.919	76.136	78.122	1.00	18.78
ATOM	224	C	ALA A	36	11.457	76.120	78.497	1.00	18.25
ATOM	225	O	ALA A	36	10.582	75.579	77.847	1.00	18.88
ATOM	226	CB	ALA A	36	13.152	77.414	77.304	1.00	17.95
ATOM	227	N	VAL A	37	11.182	76.753	79.609	1.00	18.03
ATOM	228	CA	VAL A	37	9.803	77.005	79.965	1.00	16.78
ATOM	229	C	VAL A	37	9.135	77.993	78.998	1.00	17.18
ATOM	230	O	VAL A	37	9.640	79.048	78.650	1.00	19.89
ATOM	231	CB	VAL A	37	9.740	77.500	81.436	1.00	18.33
ATOM	232	CG1	VAL A	37	10.381	76.501	82.418	1.00	13.83
ATOM	233	CG2	VAL A	37	8.300	77.825	81.832	1.00	14.21
ATOM	234	N	GLY A	38	7.952	77.616	78.561	1.00	18.34
ATOM	235	CA	GLY A	38	7.422	78.249	77.343	1.00	22.06
ATOM	236	C	GLY A	38	7.538	77.398	76.043	1.00	21.25
ATOM	237	O	GLY A	38	6.851	77.623	75.068	1.00	22.09
ATOM	238	N	SER A	39	8.422	76.401	76.060	1.00	21.73
ATOM	239	CA	SER A	39	8.520	75.487	74.905	1.00	20.30
ATOM	240	C	SER A	39	7.604	74.277	74.964	1.00	21.10
ATOM	241	O	SER A	39	7.217	73.736	76.002	1.00	19.55
ATOM	242	CB	SER A	39	9.946	74.998	74.748	1.00	15.45
ATOM	243	OG	SER A	39	10.197	73.967	75.704	1.00	15.38
ATOM	244	N	ILE A	40	7.287	73.796	73.772	1.00	17.17
ATOM	245	CA	ILE A	40	6.618	72.485	73.702	1.00	14.71
ATOM	246	C	ILE A	40	7.475	71.311	74.225	1.00	10.81
ATOM	247	O	ILE A	40	6.998	70.315	74.782	1.00	15.23
ATOM	248	CB	ILE A	40	6.102	72.235	72.219	1.00	15.78
ATOM	249	CG1	ILE A	40	5.162	73.368	71.791	1.00	15.41
ATOM	250	CG2	ILE A	40	5.406	70.863	72.091	1.00	14.54
ATOM	251	CD1	ILE A	40	4.812	73.332	70.307	1.00	18.26
ATOM	252	N	ALA A	41	8.790	71.443	74.040	1.00	10.69
ATOM	253	CA	ALA A	41	9.633	70.373	74.530	1.00	13.79
ATOM	254	C	ALA A	41	9.566	70.300	76.091	1.00	15.36
ATOM	255	O	ALA A	41	9.369	69.245	76.683	1.00	20.02
ATOM	256	CB	ALA A	41	11.046	70.610	74.065	1.00	11.61
ATOM	257	N	PHE A	42	9.547	71.495	76.702	1.00	16.94
ATOM	258	CA	PHE A	42	9.200	71.480	78.151	1.00	15.75
ATOM	259	C	PHE A	42	7.818	70.970	78.533	1.00	16.07
ATOM	260	O	PHE A	42	7.652	70.182	79.448	1.00	19.72
ATOM	261	CB	PHE A	42	9.513	72.819	78.819	1.00	17.93
ATOM	262	CG	PHE A	42	9.380	72.700	80.338	1.00	20.96
ATOM	263	CD1	PHE A	42	10.297	71.904	81.056	1.00	19.46
ATOM	264	CD2	PHE A	42	8.324	73.370	80.997	1.00	20.99
ATOM	265	CE1	PHE A	42	10.148	71.763	82.450	1.00	17.30
ATOM	266	CE2	PHE A	42	8.190	73.248	82.402	1.00	19.79
ATOM	267	CZ	PHE A	42	9.111	72.443	83.100	1.00	13.36
ATOM	268	N	LEU A	43	6.790	71.375	77.765	1.00	19.00
ATOM	269	CA	LEU A	43	5.507	70.643	77.917	1.00	19.22
ATOM	270	C	LEU A	43	5.573	69.103	77.945	1.00	19.39

THIS PAGE BLANK (USPTO)

17/47

FIG. 15

ATOM	271	O	LEU A	43	4.957	68.410	78.749	1.00	17.69
ATOM	272	CB	LEU A	43	4.472	71.003	76.826	1.00	21.60
ATOM	273	CG	LEU A	43	3.213	71.850	77.034	1.00	24.67
ATOM	274	CD1	LEU A	43	2.597	71.800	78.433	1.00	17.68
ATOM	275	CD2	LEU A	43	2.172	71.549	75.953	1.00	21.72
ATOM	276	N	ASN A	44	6.392	68.588	77.023	1.00	19.47
ATOM	277	CA	ASN A	44	6.653	67.176	77.076	1.00	19.82
ATOM	278	C	ASN A	44	7.419	66.619	78.312	1.00	17.44
ATOM	279	O	ASN A	44	7.018	65.604	78.855	1.00	15.52
ATOM	280	CB	ASN A	44	7.259	66.847	75.747	1.00	19.07
ATOM	281	CG	ASN A	44	7.491	65.366	75.643	1.00	22.97
ATOM	282	OD1	ASN A	44	8.605	64.906	75.468	1.00	30.35
ATOM	283	ND2	ASN A	44	6.444	64.588	75.862	1.00	22.13
ATOM	284	N	ASP A	45	8.482	67.324	78.726	1.00	19.71
ATOM	285	CA	ASP A	45	9.175	67.050	80.020	1.00	19.87
ATOM	286	C	ASP A	45	8.192	66.977	81.213	1.00	19.30
ATOM	287	O	ASP A	45	8.103	66.009	81.956	1.00	21.00
ATOM	288	CB	ASP A	45	10.225	68.119	80.273	1.00	13.57
ATOM	289	CG	ASP A	45	11.563	67.769	79.706	1.00	12.64
ATOM	290	OD1	ASP A	45	12.408	68.656	79.625	1.00	15.68
ATOM	291	OD2	ASP A	45	11.823	66.611	79.414	1.00	14.57
ATOM	292	N	GLN A	46	7.347	68.007	81.299	1.00	19.62
ATOM	293	CA	GLN A	46	6.199	67.904	82.220	1.00	19.44
ATOM	294	C	GLN A	46	5.259	66.702	82.166	1.00	22.23
ATOM	295	O	GLN A	46	4.960	66.057	83.175	1.00	21.67
ATOM	296	CB	GLN A	46	5.353	69.153	82.218	1.00	16.35
ATOM	297	CG	GLN A	46	6.282	70.333	82.395	1.00	18.35
ATOM	298	CD	GLN A	46	5.398	71.519	82.591	1.00	26.07
ATOM	299	OE1	GLN A	46	5.334	72.143	83.629	1.00	31.83
ATOM	300	NE2	GLN A	46	4.622	71.823	81.591	1.00	22.82
ATOM	301	N	ALA A	47	4.838	66.364	80.935	1.00	19.12
ATOM	302	CA	ALA A	47	3.979	65.187	80.813	1.00	17.83
ATOM	303	C	ALA A	47	4.661	63.871	81.172	1.00	15.90
ATOM	304	O	ALA A	47	4.065	62.940	81.701	1.00	18.55
ATOM	305	CB	ALA A	47	3.441	65.066	79.367	1.00	17.11
ATOM	306	N	MET A	48	5.970	63.818	80.841	1.00	18.16
ATOM	307	CA	MET A	48	6.799	62.644	81.235	1.00	19.52
ATOM	308	C	MET A	48	7.012	62.460	82.765	1.00	21.38
ATOM	309	O	MET A	48	6.996	61.358	83.316	1.00	20.83
ATOM	310	CB	MET A	48	8.173	62.667	80.539	1.00	21.42
ATOM	311	CG	MET A	48	8.150	62.603	78.984	1.00	29.81
ATOM	312	SD	MET A	48	7.330	61.126	78.308	1.00	36.20
ATOM	313	CE	MET A	48	5.582	61.633	78.280	1.00	33.60
ATOM	314	N	TYR A	49	7.139	63.655	83.414	1.00	21.32
ATOM	315	CA	TYR A	49	7.066	63.807	84.885	1.00	21.30
ATOM	316	C	TYR A	49	5.773	63.244	85.515	1.00	22.58
ATOM	317	O	TYR A	49	5.797	62.383	86.390	1.00	24.04
ATOM	318	CB	TYR A	49	7.304	65.282	85.217	1.00	20.61
ATOM	319	CG	TYR A	49	7.034	65.494	86.692	1.00	23.57
ATOM	320	CD1	TYR A	49	5.755	65.931	87.109	1.00	23.57
ATOM	321	CD2	TYR A	49	8.080	65.194	87.574	1.00	21.83
ATOM	322	CE1	TYR A	49	5.524	66.097	88.481	1.00	26.09
ATOM	323	CE2	TYR A	49	7.844	65.349	88.943	1.00	23.18
ATOM	324	CZ	TYR A	49	6.591	65.842	89.377	1.00	26.31

THIS PAGE BLANK (USPTO)

FIG. 16

ATOM	325	OH	TYR	A	49	6.444	66.124	90.726	1.00	29.46
ATOM	326	N	GLU	A	50	4.639	63.731	84.994	1.00	22.09
ATOM	327	CA	GLU	A	50	3.336	63.234	85.472	1.00	21.48
ATOM	328	C	GLU	A	50	3.052	61.776	85.230	1.00	23.20
ATOM	329	O	GLU	A	50	2.548	61.050	86.081	1.00	24.23
ATOM	330	CB	GLU	A	50	2.190	64.023	84.862	1.00	21.88
ATOM	331	CG	GLU	A	50	2.304	65.537	84.986	1.00	21.13
ATOM	332	CD	GLU	A	50	2.054	65.976	86.417	1.00	25.41
ATOM	333	OE1	GLU	A	50	1.887	65.138	87.287	1.00	24.65
ATOM	334	OE2	GLU	A	50	2.004	67.162	86.679	1.00	25.05
ATOM	335	N	GLN	A	51	3.479	61.343	84.032	1.00	23.02
ATOM	336	CA	GLN	A	51	3.427	59.907	83.812	1.00	24.72
ATOM	337	C	GLN	A	51	4.275	59.006	84.728	1.00	26.23
ATOM	338	O	GLN	A	51	3.804	57.996	85.253	1.00	25.10
ATOM	339	CB	GLN	A	51	3.680	59.545	82.355	1.00	24.41
ATOM	340	CG	GLN	A	51	3.461	58.028	82.141	1.00	38.05
ATOM	341	CD	GLN	A	51	2.115	57.435	82.657	1.00	53.15
ATOM	342	OE1	GLN	A	51	1.093	58.076	82.867	1.00	61.03
ATOM	343	NE2	GLN	A	51	2.098	56.123	82.834	1.00	55.24
ATOM	344	N	GLY	A	52	5.556	59.414	84.922	1.00	26.76
ATOM	345	CA	GLY	A	52	6.400	58.689	85.876	1.00	26.91
ATOM	346	C	GLY	A	52	5.793	58.681	87.286	1.00	25.60
ATOM	347	O	GLY	A	52	5.666	57.699	87.997	1.00	24.37
ATOM	348	N	ARG	A	53	5.321	59.874	87.621	1.00	28.09
ATOM	349	CA	ARG	A	53	4.527	60.032	88.834	1.00	29.75
ATOM	350	C	ARG	A	53	3.384	59.049	89.067	1.00	32.01
ATOM	351	O	ARG	A	53	3.284	58.437	90.115	1.00	34.69
ATOM	352	CB	ARG	A	53	4.128	61.494	88.965	1.00	30.41
ATOM	353	CG	ARG	A	53	3.857	61.919	90.389	1.00	29.15
ATOM	354	CD	ARG	A	53	3.519	63.393	90.461	1.00	29.38
ATOM	355	NE	ARG	A	53	2.385	63.740	89.609	1.00	31.35
ATOM	356	CZ	ARG	A	53	1.088	63.593	89.886	1.00	32.29
ATOM	357	NH1	ARG	A	53	0.187	64.144	89.125	1.00	32.06
ATOM	358	NH2	ARG	A	53	0.661	62.938	90.931	1.00	32.66
ATOM	359	N	LEU	A	54	2.575	58.839	88.033	1.00	32.47
ATOM	360	CA	LEU	A	54	1.588	57.735	88.076	1.00	31.67
ATOM	361	C	LEU	A	54	2.114	56.273	88.119	1.00	33.30
ATOM	362	O	LEU	A	54	1.452	55.329	88.568	1.00	35.90
ATOM	363	CB	LEU	A	54	0.603	57.880	86.901	1.00	33.52
ATOM	364	CG	LEU	A	54	-0.599	58.822	87.055	1.00	32.85
ATOM	365	CD1	LEU	A	54	-1.298	59.020	85.709	1.00	30.53
ATOM	366	CD2	LEU	A	54	-0.286	60.130	87.777	1.00	36.56
ATOM	367	N	LEU	A	55	3.374	56.117	87.657	1.00	31.95
ATOM	368	CA	LEU	A	55	4.016	54.784	87.735	1.00	32.70
ATOM	369	C	LEU	A	55	4.577	54.392	89.091	1.00	33.98
ATOM	370	O	LEU	A	55	4.842	53.224	89.386	1.00	32.73
ATOM	371	CB	LEU	A	55	5.194	54.646	86.790	1.00	31.04
ATOM	372	CG	LEU	A	55	4.832	54.514	85.343	1.00	28.60
ATOM	373	CD1	LEU	A	55	3.960	53.287	85.101	1.00	27.88
ATOM	374	CD2	LEU	A	55	6.118	54.471	84.539	1.00	28.33
ATOM	375	N	ARG	A	56	4.732	55.458	89.911	1.00	36.20
ATOM	376	CA	ARG	A	56	5.257	55.308	91.281	1.00	37.04
ATOM	377	C	ARG	A	56	4.616	54.240	92.164	1.00	40.28
ATOM	378	O	ARG	A	56	5.260	53.518	92.907	1.00	41.22

THIS PAGE BLANK (uspto)

FIG. 17

ATOM	379	CB	ARG	A	56	5.249	56.643	91.993	1.00	32.58
ATOM	380	CG	ARG	A	56	6.368	57.502	91.476	1.00	22.04
ATOM	381	CD	ARG	A	56	6.142	58.874	92.049	1.00	21.74
ATOM	382	NE	ARG	A	56	7.073	59.804	91.447	1.00	23.56
ATOM	383	CZ	ARG	A	56	7.062	61.074	91.750	1.00	25.56
ATOM	384	NH1	ARG	A	56	6.401	61.444	92.790	1.00	30.94
ATOM	385	NH2	ARG	A	56	7.688	61.979	91.035	1.00	22.33
ATOM	386	N	ASN	A	57	3.306	54.120	91.997	1.00	44.42
ATOM	387	CA	ASN	A	57	2.602	53.027	92.680	1.00	48.62
ATOM	388	C	ASN	A	57	2.786	51.585	92.169	1.00	47.46
ATOM	389	O	ASN	A	57	2.316	50.630	92.759	1.00	51.15
ATOM	390	CB	ASN	A	57	1.124	53.435	92.726	1.00	59.30
ATOM	391	CG	ASN	A	57	0.389	53.137	94.049	1.00	68.98
ATOM	392	OD1	ASN	A	57	-0.829	53.335	94.164	1.00	75.09
ATOM	393	ND2	ASN	A	57	1.140	52.692	95.058	1.00	71.68
ATOM	394	N	THR	A	58	3.461	51.442	91.036	1.00	42.68
ATOM	395	CA	THR	A	58	3.555	50.086	90.475	1.00	36.64
ATOM	396	C	THR	A	58	4.821	49.318	90.871	1.00	33.64
ATOM	397	O	THR	A	58	5.721	49.876	91.477	1.00	31.69
ATOM	398	CB	THR	A	58	3.492	50.189	88.948	1.00	36.81
ATOM	399	OG1	THR	A	58	4.774	50.576	88.447	1.00	37.64
ATOM	400	CG2	THR	A	58	2.432	51.203	88.507	1.00	35.36
ATOM	401	N	GLU	A	59	4.937	48.068	90.409	1.00	33.08
ATOM	402	CA	GLU	A	59	6.238	47.410	90.581	1.00	34.80
ATOM	403	C	GLU	A	59	7.487	48.104	89.944	1.00	33.45
ATOM	404	O	GLU	A	59	8.607	48.153	90.463	1.00	34.28
ATOM	405	CB	GLU	A	59	6.067	45.933	90.191	1.00	43.43
ATOM	406	CG	GLU	A	59	7.242	45.007	90.614	1.00	59.74
ATOM	407	CD	GLU	A	59	7.519	44.933	92.159	1.00	69.61
ATOM	408	OE1	GLU	A	59	6.582	45.064	92.960	1.00	74.78
ATOM	409	OE2	GLU	A	59	8.686	44.751	92.589	1.00	74.97
ATOM	410	N	ARG	A	60	7.229	48.734	88.768	1.00	27.61
ATOM	411	CA	ARG	A	60	8.251	49.599	88.158	1.00	25.02
ATOM	412	C	ARG	A	60	8.614	50.851	88.958	1.00	22.94
ATOM	413	O	ARG	A	60	9.772	51.257	89.002	1.00	24.63
ATOM	414	CB	ARG	A	60	7.874	49.966	86.690	1.00	26.16
ATOM	415	CG	ARG	A	60	8.877	50.860	85.900	1.00	24.47
ATOM	416	CD	ARG	A	60	10.268	50.249	85.758	1.00	23.96
ATOM	417	NE	ARG	A	60	11.285	51.161	85.217	1.00	25.64
ATOM	418	CZ	ARG	A	60	12.214	51.778	85.945	1.00	24.77
ATOM	419	NH1	ARG	A	60	12.159	51.805	87.261	1.00	24.78
ATOM	420	NH2	ARG	A	60	13.227	52.294	85.325	1.00	19.79
ATOM	421	N	GLY	A	61	7.562	51.411	89.587	1.00	21.94
ATOM	422	CA	GLY	A	61	7.623	52.443	90.620	1.00	22.33
ATOM	423	C	GLY	A	61	8.468	52.051	91.824	1.00	24.44
ATOM	424	O	GLY	A	61	9.350	52.773	92.253	1.00	25.22
ATOM	425	N	LYS	A	62	8.248	50.821	92.307	1.00	26.95
ATOM	426	CA	LYS	A	62	9.102	50.251	93.350	1.00	26.24
ATOM	427	C	LYS	A	62	10.590	50.158	93.045	1.00	24.89
ATOM	428	O	LYS	A	62	11.443	50.668	93.756	1.00	23.23
ATOM	429	CB	LYS	A	62	8.519	48.900	93.723	1.00	29.90
ATOM	430	CG	LYS	A	62	9.379	48.296	94.835	1.00	38.76
ATOM	431	CD	LYS	A	62	8.847	46.904	95.222	1.00	47.47
ATOM	432	CE	LYS	A	62	9.944	45.971	95.773	1.00	53.72

THIS PAGE BLANK (USPTO)

FIG. 18

ATOM	433	NZ	LYS	A	62	10.167	44.857	94.832	1.00	60.22
ATOM	434	N	LEU	A	63	10.866	49.560	91.882	1.00	24.67
ATOM	435	CA	LEU	A	63	12.239	49.634	91.346	1.00	23.65
ATOM	436	C	LEU	A	63	12.805	51.043	91.186	1.00	22.74
ATOM	437	O	LEU	A	63	13.927	51.359	91.517	1.00	25.19
ATOM	438	CB	LEU	A	63	12.232	48.973	89.981	1.00	27.11
ATOM	439	CG	LEU	A	63	13.477	48.298	89.403	1.00	31.83
ATOM	440	CD1	LEU	A	63	14.808	48.658	90.077	1.00	33.84
ATOM	441	CD2	LEU	A	63	13.440	48.410	87.874	1.00	26.95
ATOM	442	N	ALA	A	64	11.979	51.940	90.642	1.00	21.62
ATOM	443	CA	ALA	A	64	12.492	53.308	90.539	1.00	20.51
ATOM	444	C	ALA	A	64	12.862	53.971	91.863	1.00	21.79
ATOM	445	O	ALA	A	64	13.890	54.636	91.984	1.00	21.21
ATOM	446	CB	ALA	A	64	11.456	54.196	89.862	1.00	19.01
ATOM	447	N	ALA	A	65	11.984	53.747	92.870	1.00	23.25
ATOM	448	CA	ALA	A	65	12.374	54.212	94.235	1.00	24.88
ATOM	449	C	ALA	A	65	13.684	53.619	94.784	1.00	22.62
ATOM	450	O	ALA	A	65	14.551	54.328	95.268	1.00	22.95
ATOM	451	CB	ALA	A	65	11.249	54.013	95.265	1.00	25.38
ATOM	452	N	GLU	A	66	13.848	52.295	94.572	1.00	23.38
ATOM	453	CA	GLU	A	66	15.116	51.632	94.878	1.00	23.41
ATOM	454	C	GLU	A	66	16.332	52.188	94.152	1.00	26.06
ATOM	455	O	GLU	A	66	17.321	52.604	94.744	1.00	25.12
ATOM	456	CB	GLU	A	66	14.968	50.136	94.665	1.00	25.85
ATOM	457	CG	GLU	A	66	13.818	49.616	95.533	1.00	31.94
ATOM	458	CD	GLU	A	66	13.546	48.142	95.293	1.00	37.59
ATOM	459	OE1	GLU	A	66	13.147	47.430	96.220	1.00	40.33
ATOM	460	OE2	GLU	A	66	13.721	47.673	94.176	1.00	40.79
ATOM	461	N	ASP	A	67	16.204	52.276	92.817	1.00	24.01
ATOM	462	CA	ASP	A	67	17.222	52.928	91.986	1.00	19.72
ATOM	463	C	ASP	A	67	17.549	54.333	92.402	1.00	16.72
ATOM	464	O	ASP	A	67	18.694	54.767	92.414	1.00	18.91
ATOM	465	CB	ASP	A	67	16.787	52.944	90.495	1.00	21.68
ATOM	466	CG	ASP	A	67	16.824	51.580	89.801	1.00	25.22
ATOM	467	OD1	ASP	A	67	17.340	50.629	90.370	1.00	23.32
ATOM	468	OD2	ASP	A	67	16.349	51.434	88.666	1.00	26.83
ATOM	469	N	ALA	A	68	16.485	55.059	92.773	1.00	16.48
ATOM	470	CA	ALA	A	68	16.685	56.425	93.250	1.00	19.28
ATOM	471	C	ALA	A	68	17.489	56.510	94.569	1.00	20.86
ATOM	472	O	ALA	A	68	18.165	57.494	94.837	1.00	22.07
ATOM	473	CB	ALA	A	68	15.330	57.134	93.419	1.00	19.81
ATOM	474	N	ASN	A	69	17.472	55.371	95.299	1.00	23.11
ATOM	475	CA	ASN	A	69	18.330	55.262	96.514	1.00	27.41
ATOM	476	C	ASN	A	69	19.816	55.042	96.273	1.00	29.49
ATOM	477	O	ASN	A	69	20.646	55.304	97.140	1.00	28.64
ATOM	478	CB	ASN	A	69	17.933	54.145	97.466	1.00	24.19
ATOM	479	CG	ASN	A	69	16.632	54.425	98.142	1.00	25.79
ATOM	480	OD1	ASN	A	69	16.298	55.549	98.445	1.00	26.84
ATOM	481	ND2	ASN	A	69	15.894	53.359	98.410	1.00	30.16
ATOM	482	N	LEU	A	70	20.104	54.574	95.034	1.00	25.30
ATOM	483	CA	LEU	A	70	21.514	54.442	94.627	1.00	23.20
ATOM	484	C	LEU	A	70	22.329	55.691	94.640	1.00	21.41
ATOM	485	O	LEU	A	70	22.013	56.696	94.028	1.00	23.50
ATOM	486	CB	LEU	A	70	21.672	53.890	93.225	1.00	22.19

THIS PAGE BLANK (USPTO)

FIG. 19

21 / 47

ATOM	487	CG	LEU A	70	21.078	52.512	93.095	1.00	22.16
ATOM	488	CD1	LEU A	70	21.830	51.459	93.896	1.00	20.70
ATOM	489	CD2	LEU A	70	21.016	52.154	91.624	1.00	23.47
ATOM	490	N	SER A	71	23.450	55.563	95.304	1.00	21.73
ATOM	491	CA	SER A	71	24.527	56.515	95.119	1.00	22.25
ATOM	492	C	SER A	71	25.355	56.171	93.888	1.00	20.52
ATOM	493	O	SER A	71	25.269	55.081	93.357	1.00	23.70
ATOM	494	CB	SER A	71	25.453	56.521	96.349	1.00	22.74
ATOM	495	OG	SER A	71	26.232	55.303	96.432	1.00	28.68
ATOM	496	N	SER A	72	26.220	57.079	93.445	1.00	20.02
ATOM	497	CA	SER A	72	27.096	56.747	92.294	1.00	20.88
ATOM	498	C	SER A	72	27.860	55.479	92.410	1.00	22.52
ATOM	499	O	SER A	72	27.979	54.663	91.518	1.00	21.65
ATOM	500	CB	SER A	72	28.113	57.834	92.083	1.00	19.05
ATOM	501	OG	SER A	72	27.352	58.966	91.735	1.00	22.00
ATOM	502	N	GLY A	73	28.336	55.318	93.640	1.00	20.71
ATOM	503	CA	GLY A	73	28.979	54.068	94.006	1.00	16.81
ATOM	504	C	GLY A	73	28.146	52.783	93.939	1.00	15.97
ATOM	505	O	GLY A	73	28.697	51.705	93.753	1.00	20.02
ATOM	506	N	GLY A	74	26.818	52.915	94.046	1.00	16.07
ATOM	507	CA	GLY A	74	26.090	51.649	93.967	1.00	18.17
ATOM	508	C	GLY A	74	25.671	51.260	92.526	1.00	21.98
ATOM	509	O	GLY A	74	25.202	50.164	92.238	1.00	21.28
ATOM	510	N	VAL A	75	25.887	52.210	91.567	1.00	22.48
ATOM	511	CA	VAL A	75	25.521	51.777	90.174	1.00	22.71
ATOM	512	C	VAL A	75	26.174	50.493	89.628	1.00	18.50
ATOM	513	O	VAL A	75	25.497	49.573	89.210	1.00	20.32
ATOM	514	CB	VAL A	75	25.820	52.946	89.218	1.00	23.52
ATOM	515	CG1	VAL A	75	25.719	52.707	87.712	1.00	21.49
ATOM	516	CG2	VAL A	75	25.153	54.265	89.560	1.00	17.54
ATOM	517	N	ALA A	76	27.517	50.394	89.738	1.00	21.05
ATOM	518	CA	ALA A	76	28.149	49.125	89.372	1.00	20.51
ATOM	519	C	ALA A	76	27.414	47.875	89.826	1.00	24.64
ATOM	520	O	ALA A	76	27.033	47.028	89.015	1.00	24.90
ATOM	521	CB	ALA A	76	29.612	49.071	89.810	1.00	19.14
ATOM	522	N	ASN A	77	27.131	47.820	91.145	1.00	20.97
ATOM	523	CA	ASN A	77	26.463	46.601	91.622	1.00	17.62
ATOM	524	C	ASN A	77	25.019	46.464	91.205	1.00	16.57
ATOM	525	O	ASN A	77	24.536	45.350	91.024	1.00	19.24
ATOM	526	CB	ASN A	77	26.615	46.509	93.137	1.00	23.52
ATOM	527	CG	ASN A	77	25.817	45.362	93.677	1.00	21.57
ATOM	528	OD1	ASN A	77	24.672	45.508	94.079	1.00	26.66
ATOM	529	ND2	ASN A	77	26.435	44.202	93.627	1.00	24.64
ATOM	530	N	ALA A	78	24.377	47.638	91.017	1.00	17.23
ATOM	531	CA	ALA A	78	23.060	47.710	90.339	1.00	18.62
ATOM	532	C	ALA A	78	22.874	47.025	88.941	1.00	19.92
ATOM	533	O	ALA A	78	21.767	46.705	88.517	1.00	21.04
ATOM	534	CB	ALA A	78	22.636	49.160	90.208	1.00	13.62
ATOM	535	N	PHE A	79	24.025	46.748	88.292	1.00	19.22
ATOM	536	CA	PHE A	79	24.019	45.921	87.070	1.00	20.71
ATOM	537	C	PHE A	79	24.117	44.420	87.238	1.00	23.30
ATOM	538	O	PHE A	79	24.161	43.662	86.273	1.00	23.64
ATOM	539	CB	PHE A	79	25.116	46.352	86.082	1.00	18.00
ATOM	540	CG	PHE A	79	24.821	47.683	85.382	1.00	19.59

THIS PAGE BLANK (USPTO)

FIG. 20

ATOM	541	CD1	PHE	A	79	25.181	48.903	85.984	1.00	17.05
ATOM	542	CD2	PHE	A	79	24.214	47.687	84.104	1.00	18.56
ATOM	543	CE1	PHE	A	79	25.026	50.119	85.298	1.00	19.06
ATOM	544	CE2	PHE	A	79	24.040	48.906	83.419	1.00	15.97
ATOM	545	CZ	PHE	A	79	24.500	50.104	83.989	1.00	17.87
ATOM	546	N	SER	A	80	24.150	43.947	88.488	1.00	19.74
ATOM	547	CA	SER	A	80	24.500	42.511	88.632	1.00	17.29
ATOM	548	C	SER	A	80	23.601	41.501	87.944	1.00	18.57
ATOM	549	O	SER	A	80	23.977	40.494	87.339	1.00	22.38
ATOM	550	CB	SER	A	80	24.608	42.106	90.125	1.00	15.17
ATOM	551	OG	SER	A	80	25.646	42.920	90.700	1.00	17.32
ATOM	552	N	GLY	A	81	22.309	41.852	88.041	1.00	19.68
ATOM	553	CA	GLY	A	81	21.271	41.005	87.413	1.00	22.50
ATOM	554	C	GLY	A	81	21.293	40.977	85.855	1.00	24.85
ATOM	555	O	GLY	A	81	21.318	39.939	85.211	1.00	23.46
ATOM	556	N	ALA	A	82	21.380	42.197	85.279	1.00	24.60
ATOM	557	CA	ALA	A	82	21.686	42.339	83.855	1.00	24.50
ATOM	558	C	ALA	A	82	22.985	41.643	83.417	1.00	25.22
ATOM	559	O	ALA	A	82	23.000	40.873	82.468	1.00	23.42
ATOM	560	CB	ALA	A	82	21.649	43.819	83.470	1.00	20.35
ATOM	561	N	PHE	A	83	24.050	41.874	84.197	1.00	23.76
ATOM	562	CA	PHE	A	83	25.319	41.242	83.894	1.00	21.76
ATOM	563	C	PHE	A	83	25.325	39.726	83.974	1.00	22.85
ATOM	564	O	PHE	A	83	26.090	39.052	83.322	1.00	25.72
ATOM	565	CB	PHE	A	83	26.349	41.867	84.792	1.00	20.01
ATOM	566	CG	PHE	A	83	27.770	41.527	84.394	1.00	20.95
ATOM	567	CD1	PHE	A	83	28.486	40.587	85.152	1.00	16.94
ATOM	568	CD2	PHE	A	83	28.391	42.208	83.307	1.00	23.09
ATOM	569	CE1	PHE	A	83	29.841	40.355	84.843	1.00	18.79
ATOM	570	CE2	PHE	A	83	29.751	41.991	83.001	1.00	20.95
ATOM	571	CZ	PHE	A	83	30.474	41.069	83.795	1.00	21.43
ATOM	572	N	GLY	A	84	24.409	39.187	84.768	1.00	22.31
ATOM	573	CA	GLY	A	84	24.478	37.740	84.865	1.00	24.39
ATOM	574	C	GLY	A	84	25.199	37.163	86.093	1.00	29.49
ATOM	575	O	GLY	A	84	25.158	35.963	86.362	1.00	32.27
ATOM	576	N	SER	A	85	25.873	38.058	86.843	1.00	30.33
ATOM	577	CA	SER	A	85	26.685	37.625	88.001	1.00	28.46
ATOM	578	C	SER	A	85	27.047	38.788	88.936	1.00	29.06
ATOM	579	O	SER	A	85	26.915	39.945	88.556	1.00	29.00
ATOM	580	CB	SER	A	85	27.915	36.861	87.536	1.00	24.04
ATOM	581	OG	SER	A	85	28.903	37.746	87.028	1.00	28.11
ATOM	582	N	PRO	A	86	27.436	38.518	90.216	1.00	29.45
ATOM	583	CA	PRO	A	86	27.599	39.650	91.122	1.00	26.27
ATOM	584	C	PRO	A	86	28.721	40.513	90.733	1.00	22.75
ATOM	585	O	PRO	A	86	29.830	40.064	90.530	1.00	22.43
ATOM	586	CB	PRO	A	86	27.873	39.029	92.493	1.00	27.52
ATOM	587	CG	PRO	A	86	27.284	37.627	92.399	1.00	27.61
ATOM	588	CD	PRO	A	86	27.591	37.258	90.945	1.00	31.08
ATOM	589	N	ILE	A	87	28.350	41.776	90.659	1.00	22.99
ATOM	590	CA	ILE	A	87	29.363	42.816	90.469	1.00	24.80
ATOM	591	C	ILE	A	87	29.642	43.494	91.811	1.00	25.76
ATOM	592	O	ILE	A	87	28.956	44.424	92.220	1.00	24.68
ATOM	593	CB	ILE	A	87	28.908	43.860	89.427	1.00	24.26
ATOM	594	CG1	ILE	A	87	28.626	43.165	88.076	1.00	23.29

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2 3 / 4 7

F I G. 2 1

ATOM	595	CG2	ILE	A	87	29.997	44.923	89.306	1.00	23.62
ATOM	596	CD1	ILE	A	87	27.925	44.100	87.092	1.00	21.95
ATOM	597	N	THR	A	88	30.655	42.914	92.481	1.00	25.86
ATOM	598	CA	THR	A	88	30.925	43.247	93.903	1.00	25.48
ATOM	599	C	THR	A	88	32.418	43.249	94.166	1.00	25.25
ATOM	600	O	THR	A	88	33.131	42.561	93.445	1.00	24.26
ATOM	601	CB	THR	A	88	30.332	42.211	94.859	1.00	22.31
ATOM	602	OG1	THR	A	88	31.102	41.029	94.702	1.00	25.42
ATOM	603	CG2	THR	A	88	28.833	41.943	94.710	1.00	19.45
ATOM	604	N	GLU	A	89	32.891	43.970	95.204	1.00	26.63
ATOM	605	CA	GLU	A	89	34.322	43.845	95.577	1.00	25.29
ATOM	606	C	GLU	A	89	34.810	42.429	95.889	1.00	25.30
ATOM	607	O	GLU	A	89	35.924	41.999	95.611	1.00	26.30
ATOM	608	CB	GLU	A	89	34.652	44.773	96.741	1.00	25.64
ATOM	609	CG	GLU	A	89	34.334	46.193	96.340	1.00	26.52
ATOM	610	CD	GLU	A	89	34.551	47.228	97.414	1.00	29.70
ATOM	611	OE1	GLU	A	89	35.136	48.245	97.123	1.00	33.05
ATOM	612	OE2	GLU	A	89	34.138	47.077	98.540	1.00	27.59
ATOM	613	N	LYS	A	90	33.860	41.697	96.459	1.00	26.25
ATOM	614	CA	LYS	A	90	34.095	40.310	96.883	1.00	28.81
ATOM	615	C	LYS	A	90	34.285	39.313	95.780	1.00	28.19
ATOM	616	O	LYS	A	90	35.206	38.518	95.773	1.00	30.49
ATOM	617	CB	LYS	A	90	32.889	39.869	97.672	1.00	31.00
ATOM	618	CG	LYS	A	90	32.956	38.478	98.228	1.00	37.00
ATOM	619	CD	LYS	A	90	31.536	38.026	98.583	1.00	43.53
ATOM	620	CE	LYS	A	90	31.386	36.504	98.712	1.00	50.17
ATOM	621	NZ	LYS	A	90	32.257	35.875	97.701	1.00	60.80
ATOM	622	N	ASP	A	91	33.324	39.416	94.870	1.00	28.68
ATOM	623	CA	ASP	A	91	33.271	38.504	93.738	1.00	29.34
ATOM	624	C	ASP	A	91	33.911	38.947	92.420	1.00	29.37
ATOM	625	O	ASP	A	91	34.429	38.173	91.635	1.00	31.54
ATOM	626	CB	ASP	A	91	31.827	38.162	93.438	1.00	30.91
ATOM	627	CG	ASP	A	91	31.087	37.722	94.674	1.00	31.69
ATOM	628	OD1	ASP	A	91	31.395	36.657	95.212	1.00	35.66
ATOM	629	OD2	ASP	A	91	30.186	38.438	95.088	1.00	29.63
ATOM	630	N	ALA	A	92	33.830	40.240	92.165	1.00	28.62
ATOM	631	CA	ALA	A	92	34.443	40.713	90.919	1.00	26.75
ATOM	632	C	ALA	A	92	35.255	41.981	91.131	1.00	26.94
ATOM	633	O	ALA	A	92	34.937	43.081	90.690	1.00	26.94
ATOM	634	CB	ALA	A	92	33.390	40.934	89.817	1.00	23.93
ATOM	635	N	PRO	A	93	36.336	41.826	91.930	1.00	27.16
ATOM	636	CA	PRO	A	93	37.151	43.015	92.274	1.00	25.78
ATOM	637	C	PRO	A	93	37.832	43.865	91.160	1.00	24.62
ATOM	638	O	PRO	A	93	37.844	45.098	91.178	1.00	22.75
ATOM	639	CB	PRO	A	93	38.120	42.411	93.292	1.00	25.31
ATOM	640	CG	PRO	A	93	38.219	40.926	92.945	1.00	23.54
ATOM	641	CD	PRO	A	93	36.817	40.578	92.534	1.00	25.29
ATOM	642	N	ALA	A	94	38.409	43.174	90.170	1.00	25.16
ATOM	643	CA	ALA	A	94	38.954	43.886	89.005	1.00	23.77
ATOM	644	C	ALA	A	94	37.923	44.715	88.249	1.00	17.72
ATOM	645	O	ALA	A	94	38.116	45.897	88.005	1.00	19.91
ATOM	646	CB	ALA	A	94	39.676	42.931	88.058	1.00	21.52
ATOM	647	N	LEU	A	95	36.787	44.081	88.026	1.00	19.68
ATOM	648	CA	LEU	A	95	35.577	44.770	87.539	1.00	20.23

THIS PAGE BLANK (USPTO)

F I G. 2 2

ATOM	649	C	LEU	A	95	35.001	45.902	88.385	1.00	21.85
ATOM	650	O	LEU	A	95	34.809	47.026	87.943	1.00	21.66
ATOM	651	CB	LEU	A	95	34.466	43.755	87.271	1.00	20.70
ATOM	652	CG	LEU	A	95	33.250	44.285	86.467	1.00	21.32
ATOM	653	CD1	LEU	A	95	32.299	43.149	86.063	1.00	20.10
ATOM	654	CD2	LEU	A	95	33.698	45.111	85.240	1.00	20.93
ATOM	655	N	HIS	A	96	34.755	45.606	89.667	1.00	21.70
ATOM	656	CA	HIS	A	96	34.313	46.691	90.543	1.00	17.84
ATOM	657	C	HIS	A	96	35.214	47.924	90.580	1.00	17.76
ATOM	658	O	HIS	A	96	34.767	49.069	90.496	1.00	19.44
ATOM	659	CB	HIS	A	96	34.042	46.116	91.937	1.00	20.62
ATOM	660	CG	HIS	A	96	32.934	46.893	92.613	1.00	21.96
ATOM	661	ND1	HIS	A	96	33.021	48.094	93.229	1.00	21.34
ATOM	662	CD2	HIS	A	96	31.614	46.470	92.680	1.00	24.62
ATOM	663	CE1	HIS	A	96	31.790	48.442	93.690	1.00	18.16
ATOM	664	NE2	HIS	A	96	30.923	47.437	93.338	1.00	23.59
ATOM	665	N	LYS	A	97	36.539	47.639	90.629	1.00	18.11
ATOM	666	CA	LYS	A	97	37.544	48.713	90.581	1.00	18.50
ATOM	667	C	LYS	A	97	37.519	49.564	89.317	1.00	20.80
ATOM	668	O	LYS	A	97	37.452	50.781	89.373	1.00	21.08
ATOM	669	CB	LYS	A	97	38.924	48.085	90.766	1.00	17.26
ATOM	670	CG	LYS	A	97	40.125	49.014	90.594	1.00	21.24
ATOM	671	CD	LYS	A	97	40.283	50.213	91.525	1.00	30.10
ATOM	672	CE	LYS	A	97	41.482	51.160	91.164	1.00	33.55
ATOM	673	NZ	LYS	A	97	41.557	52.449	91.915	1.00	29.55
ATOM	674	N	LEU	A	98	37.532	48.857	88.155	1.00	22.36
ATOM	675	CA	LEU	A	98	37.291	49.555	86.851	1.00	22.04
ATOM	676	C	LEU	A	98	36.128	50.581	86.806	1.00	17.59
ATOM	677	O	LEU	A	98	36.223	51.763	86.522	1.00	18.13
ATOM	678	CB	LEU	A	98	37.025	48.477	85.780	1.00	21.44
ATOM	679	CG	LEU	A	98	36.766	49.042	84.375	1.00	20.93
ATOM	680	CD1	LEU	A	98	36.265	47.902	83.493	1.00	22.92
ATOM	681	CD2	LEU	A	98	37.963	49.801	83.811	1.00	18.27
ATOM	682	N	LEU	A	99	34.977	50.024	87.188	1.00	19.16
ATOM	683	CA	LEU	A	99	33.753	50.802	87.186	1.00	18.37
ATOM	684	C	LEU	A	99	33.644	51.930	88.169	1.00	20.61
ATOM	685	O	LEU	A	99	33.068	52.964	87.883	1.00	18.31
ATOM	686	CB	LEU	A	99	32.545	49.874	87.263	1.00	18.90
ATOM	687	CG	LEU	A	99	32.428	48.860	86.191	1.00	20.87
ATOM	688	CD1	LEU	A	99	32.464	49.503	84.841	1.00	14.73
ATOM	689	CD2	LEU	A	99	31.190	48.099	86.497	1.00	19.82
ATOM	690	N	THR	A	100	34.252	51.692	89.359	1.00	22.03
ATOM	691	CA	THR	A	100	34.357	52.777	90.360	1.00	19.41
ATOM	692	C	THR	A	100	35.259	53.938	89.957	1.00	16.72
ATOM	693	O	THR	A	100	34.984	55.118	90.136	1.00	16.55
ATOM	694	CB	THR	A	100	34.889	52.174	91.674	1.00	19.50
ATOM	695	OG1	THR	A	100	34.030	51.113	92.091	1.00	19.99
ATOM	696	CG2	THR	A	100	35.092	53.221	92.758	1.00	21.12
ATOM	697	N	ASN	A	101	36.397	53.537	89.358	1.00	20.56
ATOM	698	CA	ASN	A	101	37.415	54.515	88.998	1.00	19.91
ATOM	699	C	ASN	A	101	37.022	55.479	87.873	1.00	21.88
ATOM	700	O	ASN	A	101	37.610	56.546	87.711	1.00	22.38
ATOM	701	CB	ASN	A	101	38.692	53.763	88.716	1.00	20.98
ATOM	702	CG	ASN	A	101	39.950	54.556	89.041	1.00	22.36

THIS PAGE BLANK (USPTO)

25 / 47

FIG. 23

ATOM	703	OD1	ASN	A	101	40.938	53.978	89.459	1.00	30.43
ATOM	704	ND2	ASN	A	101	39.964	55.868	88.889	1.00	23.45
ATOM	705	N	MET	A	102	35.952	55.090	87.154	1.00	21.94
ATOM	706	CA	MET	A	102	35.407	55.984	86.103	1.00	22.28
ATOM	707	C	MET	A	102	34.142	56.755	86.455	1.00	22.36
ATOM	708	O	MET	A	102	33.571	57.482	85.638	1.00	23.37
ATOM	709	CB	MET	A	102	35.162	55.213	84.781	1.00	19.03
ATOM	710	CG	MET	A	102	34.239	54.001	84.972	1.00	18.05
ATOM	711	SD	MET	A	102	33.744	53.082	83.481	1.00	20.07
ATOM	712	CE	MET	A	102	32.429	54.165	83.010	1.00	16.04
ATOM	713	N	ILE	A	103	33.681	56.555	87.724	1.00	21.00
ATOM	714	CA	ILE	A	103	32.441	57.221	88.180	1.00	18.78
ATOM	715	C	ILE	A	103	32.371	58.697	87.833	1.00	17.38
ATOM	716	O	ILE	A	103	31.413	59.152	87.245	1.00	18.08
ATOM	717	CB	ILE	A	103	32.174	57.025	89.732	1.00	16.18
ATOM	718	CG1	ILE	A	103	31.696	55.603	90.031	1.00	19.21
ATOM	719	CG2	ILE	A	103	31.135	58.037	90.272	1.00	12.63
ATOM	720	CD1	ILE	A	103	31.708	55.185	91.522	1.00	17.58
ATOM	721	N	GLU	A	104	33.426	59.429	88.218	1.00	18.81
ATOM	722	CA	GLU	A	104	33.369	60.900	88.092	1.00	18.36
ATOM	723	C	GLU	A	104	33.828	61.520	86.772	1.00	19.60
ATOM	724	O	GLU	A	104	33.420	62.606	86.365	1.00	19.13
ATOM	725	CB	GLU	A	104	34.092	61.600	89.241	1.00	18.56
ATOM	726	CG	GLU	A	104	33.446	61.448	90.617	1.00	19.21
ATOM	727	CD	GLU	A	104	31.994	61.944	90.665	1.00	23.36
ATOM	728	OE1	GLU	A	104	31.225	61.359	91.382	1.00	26.94
ATOM	729	OE2	GLU	A	104	31.574	62.888	90.013	1.00	28.46
ATOM	730	N	ASP	A	105	34.606	60.713	86.049	1.00	18.95
ATOM	731	CA	ASP	A	105	34.743	60.936	84.587	1.00	17.40
ATOM	732	C	ASP	A	105	33.378	61.099	83.886	1.00	15.12
ATOM	733	O	ASP	A	105	33.104	62.102	83.234	1.00	18.61
ATOM	734	CB	ASP	A	105	35.429	59.743	83.951	1.00	16.81
ATOM	735	CG	ASP	A	105	36.831	59.545	84.440	1.00	15.10
ATOM	736	OD1	ASP	A	105	37.573	60.520	84.573	1.00	19.01
ATOM	737	OD2	ASP	A	105	37.177	58.402	84.685	1.00	15.56
ATOM	738	N	ALA	A	106	32.500	60.091	84.096	1.00	15.05
ATOM	739	CA	ALA	A	106	31.111	60.157	83.607	1.00	15.61
ATOM	740	C	ALA	A	106	30.166	61.126	84.315	1.00	19.62
ATOM	741	O	ALA	A	106	29.409	61.881	83.720	1.00	18.83
ATOM	742	CB	ALA	A	106	30.467	58.782	83.682	1.00	11.73
ATOM	743	N	GLY	A	107	30.263	61.102	85.674	1.00	21.49
ATOM	744	CA	GLY	A	107	29.323	61.899	86.503	1.00	16.83
ATOM	745	C	GLY	A	107	29.599	63.356	86.594	1.00	14.80
ATOM	746	O	GLY	A	107	28.714	64.204	86.575	1.00	17.67
ATOM	747	N	ASP	A	108	30.899	63.611	86.662	1.00	16.37
ATOM	748	CA	ASP	A	108	31.305	65.002	86.772	1.00	17.18
ATOM	749	C	ASP	A	108	31.877	65.572	85.485	1.00	18.56
ATOM	750	O	ASP	A	108	31.324	66.472	84.877	1.00	18.77
ATOM	751	CB	ASP	A	108	32.282	65.144	87.947	1.00	16.92
ATOM	752	CG	ASP	A	108	32.862	66.530	88.143	1.00	21.34
ATOM	753	OD1	ASP	A	108	32.247	67.528	87.812	1.00	23.69
ATOM	754	OD2	ASP	A	108	33.983	66.642	88.614	1.00	27.32
ATOM	755	N	LEU	A	109	33.049	65.065	85.107	1.00	18.48
ATOM	756	CA	LEU	A	109	33.814	65.703	84.005	1.00	20.77

THIS PAGE BLANK (USPTO)

F I G. 24

ATOM	757	C	LEU A 109	32.954	65.922	82.752	1.00	21.46
ATOM	758	O	LEU A 109	32.905	67.026	82.199	1.00	23.24
ATOM	759	CB	LEU A 109	35.024	64.826	83.679	1.00	20.60
ATOM	760	CG	LEU A 109	36.393	65.285	84.113	1.00	21.65
ATOM	761	CD1	LEU A 109	37.408	64.213	84.096	1.00	17.20
ATOM	762	CD2	LEU A 109	36.469	66.186	85.254	1.00	20.25
ATOM	763	N	ALA A 110	32.206	64.812	82.422	1.00	21.81
ATOM	764	CA	ALA A 110	31.336	64.771	81.215	1.00	20.79
ATOM	765	C	ALA A 110	30.074	65.608	81.232	1.00	23.23
ATOM	766	O	ALA A 110	29.504	65.885	80.182	1.00	23.66
ATOM	767	CB	ALA A 110	30.921	63.333	80.868	1.00	20.49
ATOM	768	N	THR A 111	29.672	66.038	82.465	1.00	20.15
ATOM	769	CA	THR A 111	28.453	66.863	82.653	1.00	19.21
ATOM	770	C	THR A 111	28.654	68.292	83.132	1.00	18.58
ATOM	771	O	THR A 111	27.754	69.106	83.131	1.00	18.77
ATOM	772	CB	THR A 111	27.469	66.257	83.628	1.00	18.46
ATOM	773	OG1	THR A 111	28.011	66.399	84.949	1.00	23.25
ATOM	774	CG2	THR A 111	27.094	64.802	83.347	1.00	15.78
ATOM	775	N	ARG A 112	29.870	68.595	83.547	1.00	20.94
ATOM	776	CA	ARG A 112	30.068	69.805	84.369	1.00	22.62
ATOM	777	C	ARG A 112	29.745	71.185	83.786	1.00	23.68
ATOM	778	O	ARG A 112	29.035	72.025	84.325	1.00	21.09
ATOM	779	CB	ARG A 112	31.512	69.782	84.911	1.00	22.88
ATOM	780	CG	ARG A 112	31.847	70.852	85.952	1.00	22.67
ATOM	781	CD	ARG A 112	33.319	70.922	86.319	1.00	18.55
ATOM	782	NE	ARG A 112	33.831	69.709	86.930	1.00	22.11
ATOM	783	CZ	ARG A 112	35.138	69.496	86.853	1.00	21.99
ATOM	784	NH1	ARG A 112	35.949	70.322	86.227	1.00	23.29
ATOM	785	NH2	ARG A 112	35.623	68.436	87.414	1.00	23.83
ATOM	786	N	SER A 113	30.323	71.398	82.583	1.00	21.66
ATOM	787	CA	SER A 113	30.146	72.736	81.981	1.00	19.14
ATOM	788	C	SER A 113	28.721	73.124	81.629	1.00	20.09
ATOM	789	O	SER A 113	28.288	74.263	81.806	1.00	23.06
ATOM	790	CB	SER A 113	31.029	72.919	80.732	1.00	24.64
ATOM	791	OG	SER A 113	30.812	71.854	79.778	1.00	25.18
ATOM	792	N	ALA A 114	27.955	72.094	81.186	1.00	19.43
ATOM	793	CA	ALA A 114	26.510	72.272	80.944	1.00	17.15
ATOM	794	C	ALA A 114	25.695	72.377	82.247	1.00	16.95
ATOM	795	O	ALA A 114	24.890	73.293	82.402	1.00	17.79
ATOM	796	CB	ALA A 114	25.935	71.096	80.117	1.00	15.05
ATOM	797	N	LYS A 115	25.993	71.462	83.200	1.00	18.76
ATOM	798	CA	LYS A 115	25.431	71.618	84.559	1.00	20.52
ATOM	799	C	LYS A 115	25.524	73.029	85.143	1.00	18.24
ATOM	800	O	LYS A 115	24.535	73.710	85.429	1.00	19.61
ATOM	801	CB	LYS A 115	26.048	70.606	85.508	1.00	17.41
ATOM	802	CG	LYS A 115	25.304	69.294	85.482	1.00	22.93
ATOM	803	CD	LYS A 115	25.867	68.477	86.654	1.00	26.73
ATOM	804	CE	LYS A 115	25.353	67.039	86.850	1.00	26.14
ATOM	805	NZ	LYS A 115	23.888	67.023	87.009	1.00	26.36
ATOM	806	N	ASP A 116	26.784	73.454	85.203	1.00	19.25
ATOM	807	CA	ASP A 116	27.073	74.739	85.832	1.00	20.02
ATOM	808	C	ASP A 116	26.589	75.938	85.076	1.00	23.51
ATOM	809	O	ASP A 116	26.208	76.967	85.612	1.00	24.69
ATOM	810	CB	ASP A 116	28.573	74.896	86.053	1.00	22.26

THIS PAGE BLANK (USPTO)

27 / 47

FIG. 25

ATOM	811	CG	ASP	A	116	29.203	73.871	87.029	1.00	25.80
ATOM	812	OD1	ASP	A	116	28.502	73.085	87.657	1.00	27.77
ATOM	813	OD2	ASP	A	116	30.431	73.847	87.166	1.00	28.44
ATOM	814	N	HIS	A	117	26.596	75.793	83.741	1.00	23.53
ATOM	815	CA	HIS	A	117	26.022	76.894	82.957	1.00	21.71
ATOM	816	C	HIS	A	117	24.496	77.044	83.026	1.00	20.75
ATOM	817	O	HIS	A	117	23.932	78.108	83.223	1.00	20.51
ATOM	818	CB	HIS	A	117	26.536	76.787	81.501	1.00	22.93
ATOM	819	CG	HIS	A	117	25.987	77.909	80.635	1.00	22.08
ATOM	820	ND1	HIS	A	117	26.531	79.128	80.459	1.00	23.33
ATOM	821	CD2	HIS	A	117	24.824	77.852	79.881	1.00	22.30
ATOM	822	CE1	HIS	A	117	25.741	79.836	79.615	1.00	23.49
ATOM	823	NE2	HIS	A	117	24.693	79.041	79.262	1.00	23.57
ATOM	824	N	TYR	A	118	23.825	75.906	82.825	1.00	19.95
ATOM	825	CA	TYR	A	118	22.363	76.013	82.795	1.00	19.91
ATOM	826	C	TYR	A	118	21.711	76.075	84.159	1.00	22.89
ATOM	827	O	TYR	A	118	20.615	76.596	84.278	1.00	22.53
ATOM	828	CB	TYR	A	118	21.702	74.869	82.020	1.00	18.70
ATOM	829	CG	TYR	A	118	22.112	74.964	80.550	1.00	19.86
ATOM	830	CD1	TYR	A	118	21.604	76.030	79.775	1.00	20.81
ATOM	831	CD2	TYR	A	118	22.998	74.004	80.005	1.00	20.19
ATOM	832	CE1	TYR	A	118	21.964	76.104	78.410	1.00	24.18
ATOM	833	CE2	TYR	A	118	23.393	74.097	78.652	1.00	22.07
ATOM	834	CZ	TYR	A	118	22.841	75.133	77.869	1.00	24.85
ATOM	835	OH	TYR	A	118	23.138	75.231	76.525	1.00	25.02
ATOM	836	N	MET	A	119	22.385	75.453	85.158	1.00	22.72
ATOM	837	CA	MET	A	119	21.795	75.408	86.516	1.00	25.49
ATOM	838	C	MET	A	119	20.328	75.033	86.619	1.00	22.79
ATOM	839	O	MET	A	119	19.526	75.639	87.309	1.00	23.65
ATOM	840	CB	MET	A	119	22.009	76.758	87.200	1.00	31.90
ATOM	841	CG	MET	A	119	23.479	77.200	87.296	1.00	41.79
ATOM	842	SD	MET	A	119	23.683	78.779	88.163	1.00	50.25
ATOM	843	CE	MET	A	119	22.932	79.838	86.910	1.00	48.37
ATOM	844	N	ARG	A	120	19.958	74.021	85.840	1.00	21.05
ATOM	845	CA	ARG	A	120	18.529	73.782	85.704	1.00	19.45
ATOM	846	C	ARG	A	120	17.877	73.247	86.989	1.00	16.34
ATOM	847	O	ARG	A	120	18.483	72.369	87.587	1.00	17.21
ATOM	848	CB	ARG	A	120	18.345	72.757	84.558	1.00	16.25
ATOM	849	CG	ARG	A	120	16.913	72.517	84.063	1.00	17.39
ATOM	850	CD	ARG	A	120	16.775	71.558	82.842	1.00	19.83
ATOM	851	NE	ARG	A	120	15.450	71.636	82.189	1.00	20.39
ATOM	852	CZ	ARG	A	120	14.929	70.642	81.479	1.00	12.14
ATOM	853	NH1	ARG	A	120	15.600	69.574	81.259	1.00	12.74
ATOM	854	NH2	ARG	A	120	13.724	70.767	81.007	1.00	15.75
ATOM	855	N	ILE	A	121	16.676	73.723	87.290	1.00	16.46
ATOM	856	CA	ILE	A	121	15.807	73.186	88.360	1.00	22.91
ATOM	857	C	ILE	A	121	15.258	71.795	88.080	1.00	23.50
ATOM	858	O	ILE	A	121	14.648	71.571	87.043	1.00	26.14
ATOM	859	CB	ILE	A	121	14.594	74.134	88.686	1.00	25.98
ATOM	860	CG1	ILE	A	121	14.986	75.592	88.783	1.00	29.16
ATOM	861	CG2	ILE	A	121	13.793	73.870	89.982	1.00	23.20
ATOM	862	CD1	ILE	A	121	16.075	75.914	89.785	1.00	29.73
ATOM	863	N	ARG	A	122	15.463	70.877	89.036	1.00	21.01
ATOM	864	CA	ARG	A	122	14.883	69.534	88.976	1.00	19.80

THIS PAGE BLANK (USPTO)

28 / 47

F I G. 26

ATOM	865	C	ARG A 122	13.372	69.532	89.091	1.00	17.61
ATOM	866	O	ARG A 122	12.805	70.488	89.613	1.00	18.79
ATOM	867	CB	ARG A 122	15.533	68.653	90.033	1.00	17.47
ATOM	868	CG	ARG A 122	17.023	68.706	89.841	1.00	18.78
ATOM	869	CD	ARG A 122	17.721	67.861	90.852	1.00	21.00
ATOM	870	NE	ARG A 122	19.141	68.121	90.748	1.00	28.80
ATOM	871	CZ	ARG A 122	19.914	67.081	90.491	1.00	34.31
ATOM	872	NH1	ARG A 122	19.401	65.871	90.426	1.00	40.28
ATOM	873	NH2	ARG A 122	21.196	67.257	90.289	1.00	32.47
ATOM	874	N	PRO A 123	12.700	68.460	88.577	1.00	17.64
ATOM	875	CA	PRO A 123	11.243	68.461	88.684	1.00	18.56
ATOM	876	C	PRO A 123	10.668	68.630	90.118	1.00	20.86
ATOM	877	O	PRO A 123	9.881	69.536	90.331	1.00	20.65
ATOM	878	CB	PRO A 123	10.808	67.150	88.004	1.00	16.86
ATOM	879	CG	PRO A 123	12.028	66.572	87.296	1.00	15.55
ATOM	880	CD	PRO A 123	13.235	67.291	87.881	1.00	15.48
ATOM	881	N	PHE A 124	11.077	67.771	91.105	1.00	21.82
ATOM	882	CA	PHE A 124	10.489	67.948	92.468	1.00	20.01
ATOM	883	C	PHE A 124	10.541	69.394	93.016	1.00	16.73
ATOM	884	O	PHE A 124	9.581	69.970	93.486	1.00	17.82
ATOM	885	CB	PHE A 124	11.044	66.869	93.422	1.00	17.84
ATOM	886	CG	PHE A 124	12.484	67.199	93.795	1.00	19.87
ATOM	887	CD1	PHE A 124	12.748	68.117	94.850	1.00	20.96
ATOM	888	CD2	PHE A 124	13.554	66.632	93.075	1.00	19.87
ATOM	889	CE1	PHE A 124	14.068	68.524	95.134	1.00	21.78
ATOM	890	CE2	PHE A 124	14.881	67.014	93.381	1.00	21.98
ATOM	891	CZ	PHE A 124	15.129	67.975	94.386	1.00	23.27
ATOM	892	N	ALA A 125	11.681	70.039	92.775	1.00	18.30
ATOM	893	CA	ALA A 125	11.866	71.464	93.089	1.00	20.06
ATOM	894	C	ALA A 125	11.033	72.481	92.291	1.00	24.90
ATOM	895	O	ALA A 125	10.455	73.445	92.789	1.00	24.77
ATOM	896	CB	ALA A 125	13.358	71.840	92.990	1.00	16.96
ATOM	897	N	PHE A 126	10.941	72.202	90.977	1.00	23.91
ATOM	898	CA	PHE A 126	10.017	72.958	90.145	1.00	22.66
ATOM	899	C	PHE A 126	8.590	72.919	90.692	1.00	20.74
ATOM	900	O	PHE A 126	7.910	73.945	90.785	1.00	21.66
ATOM	901	CB	PHE A 126	10.051	72.379	88.705	1.00	19.61
ATOM	902	CG	PHE A 126	9.147	73.140	87.765	1.00	16.99
ATOM	903	CD1	PHE A 126	9.669	74.211	87.022	1.00	15.15
ATOM	904	CD2	PHE A 126	7.794	72.757	87.656	1.00	17.75
ATOM	905	CE1	PHE A 126	8.824	74.913	86.144	1.00	14.16
ATOM	906	CE2	PHE A 126	6.940	73.472	86.799	1.00	17.56
ATOM	907	CZ	PHE A 126	7.471	74.538	86.048	1.00	12.93
ATOM	908	N	TYR A 127	8.183	71.664	91.002	1.00	20.13
ATOM	909	CA	TYR A 127	6.843	71.414	91.525	1.00	20.41
ATOM	910	C	TYR A 127	6.642	71.689	93.032	1.00	24.41
ATOM	911	O	TYR A 127	5.525	71.665	93.532	1.00	23.70
ATOM	912	CB	TYR A 127	6.370	69.994	91.207	1.00	20.85
ATOM	913	CG	TYR A 127	6.198	69.850	89.697	1.00	25.51
ATOM	914	CD1	TYR A 127	7.200	69.185	88.947	1.00	27.02
ATOM	915	CD2	TYR A 127	5.064	70.407	89.065	1.00	25.24
ATOM	916	CE1	TYR A 127	7.057	69.037	87.552	1.00	28.75
ATOM	917	CE2	TYR A 127	4.907	70.261	87.663	1.00	28.24
ATOM	918	CZ	TYR A 127	5.891	69.543	86.936	1.00	28.76

THIS PAGE BLANK (USPTO)

FIG. 27

ATOM	919	OH	TYR A 127	5.716	69.314	85.588	1.00	27.53
ATOM	920	N	GLY A 128	7.764	71.960	93.723	1.00	23.74
ATOM	921	CA	GLY A 128	7.675	72.217	95.170	1.00	24.88
ATOM	922	C	GLY A 128	7.138	71.011	95.924	1.00	24.57
ATOM	923	O	GLY A 128	6.383	71.095	96.866	1.00	29.82
ATOM	924	N	VAL A 129	7.527	69.854	95.426	1.00	24.16
ATOM	925	CA	VAL A 129	7.144	68.604	96.044	1.00	23.21
ATOM	926	C	VAL A 129	8.377	67.802	96.358	1.00	24.99
ATOM	927	O	VAL A 129	9.529	68.188	96.189	1.00	25.90
ATOM	928	CB	VAL A 129	6.193	67.776	95.187	1.00	22.38
ATOM	929	CG1	VAL A 129	6.738	67.390	93.815	1.00	17.75
ATOM	930	CG2	VAL A 129	4.895	68.549	95.125	1.00	24.52
ATOM	931	N	SER A 130	8.089	66.617	96.832	1.00	25.98
ATOM	932	CA	SER A 130	9.242	65.724	96.973	1.00	29.71
ATOM	933	C	SER A 130	9.322	64.672	95.895	1.00	29.73
ATOM	934	O	SER A 130	8.403	64.485	95.103	1.00	30.28
ATOM	935	CB	SER A 130	9.183	64.999	98.309	1.00	35.36
ATOM	936	OG	SER A 130	7.964	64.244	98.427	1.00	41.61
ATOM	937	N	THR A 131	10.440	63.952	95.934	1.00	30.35
ATOM	938	CA	THR A 131	10.533	62.819	94.996	1.00	27.90
ATOM	939	C	THR A 131	9.733	61.569	95.361	1.00	28.80
ATOM	940	O	THR A 131	9.051	61.508	96.366	1.00	30.16
ATOM	941	CB	THR A 131	11.996	62.471	94.783	1.00	26.62
ATOM	942	OG1	THR A 131	12.500	61.841	95.953	1.00	29.21
ATOM	943	CG2	THR A 131	12.839	63.682	94.446	1.00	19.32
ATOM	944	N	CYS A 132	9.835	60.528	94.551	1.00	27.12
ATOM	945	CA	CYS A 132	9.203	59.271	94.996	1.00	27.75
ATOM	946	C	CYS A 132	9.911	58.540	96.137	1.00	28.96
ATOM	947	O	CYS A 132	9.556	57.487	96.634	1.00	28.80
ATOM	948	CB	CYS A 132	9.081	58.274	93.831	1.00	24.68
ATOM	949	SG	CYS A 132	10.538	57.273	93.459	1.00	24.12
ATOM	950	N	ASN A 133	11.021	59.158	96.447	1.00	33.31
ATOM	951	CA	ASN A 133	12.012	58.492	97.236	1.00	39.44
ATOM	952	C	ASN A 133	12.008	58.776	98.750	1.00	45.19
ATOM	953	O	ASN A 133	12.269	57.928	99.583	1.00	50.38
ATOM	954	CB	ASN A 133	13.285	58.876	96.522	1.00	35.83
ATOM	955	CG	ASN A 133	14.294	57.823	96.731	1.00	37.18
ATOM	956	OD1	ASN A 133	15.478	58.059	96.663	1.00	38.83
ATOM	957	ND2	ASN A 133	13.815	56.623	97.017	1.00	42.51
ATOM	958	N	THR A 134	11.642	59.993	99.118	1.00	48.69
ATOM	959	CA	THR A 134	12.585	61.110	98.925	1.00	56.17
ATOM	960	C	THR A 134	13.935	61.171	99.735	1.00	61.49
ATOM	961	OCT1	THR A 134	14.052	60.565	100.816	1.00	66.36
ATOM	962	OCT2	THR A 134	14.937	61.779	99.291	1.00	63.18
ATOM	963	CB	THR A 134	11.704	62.374	98.968	1.00	56.04
ATOM	964	OG1	THR A 134	12.306	63.614	98.469	1.00	56.23
ATOM	965	CG2	THR A 134	10.869	62.400	100.243	1.00	53.77
ATOM	966	N	GLN A 137	16.953	60.437	100.819	1.00	100.00
ATOM	967	CA	GLN A 137	17.845	60.498	102.027	1.00	99.78
ATOM	968	C	GLN A 137	19.036	61.512	102.211	1.00	98.61
ATOM	969	O	GLN A 137	19.386	61.891	103.324	1.00	97.54
ATOM	970	CB	GLN A 137	18.343	59.083	102.397	1.00	100.00
ATOM	971	CG	GLN A 137	17.669	58.407	103.615	1.00	99.38
ATOM	972	CD	GLN A 137	18.060	59.017	104.963	1.00	98.64

THIS PAGE BLANK (USPTO)

F I G. 2 8

ATOM	973	OE1	GLN	A	137	17.484	58.784	106.009	1.00	98.03
ATOM	974	NE2	GLN	A	137	19.086	59.847	104.972	1.00	100.00
ATOM	975	N	ASP	A	138	19.627	61.949	101.081	1.00	97.91
ATOM	976	CA	ASP	A	138	20.479	63.151	101.162	1.00	95.99
ATOM	977	C	ASP	A	138	19.761	64.494	101.063	1.00	93.86
ATOM	978	O	ASP	A	138	18.589	64.579	100.711	1.00	92.76
ATOM	979	CB	ASP	A	138	21.585	63.102	100.115	1.00	97.46
ATOM	980	CG	ASP	A	138	22.893	62.963	100.866	1.00	100.00
ATOM	981	OD1	ASP	A	138	23.371	61.842	101.028	1.00	100.00
ATOM	982	OD2	ASP	A	138	23.432	63.969	101.333	1.00	100.00
ATOM	983	N	LYS	A	139	20.494	65.564	101.380	1.00	92.69
ATOM	984	CA	LYS	A	139	19.813	66.855	101.218	1.00	91.50
ATOM	985	C	LYS	A	139	19.719	67.313	99.775	1.00	88.92
ATOM	986	O	LYS	A	139	20.557	68.082	99.308	1.00	89.47
ATOM	987	CB	LYS	A	139	20.464	67.987	102.010	1.00	94.21
ATOM	988	CG	LYS	A	139	19.574	69.246	102.020	1.00	96.82
ATOM	989	CD	LYS	A	139	20.362	70.569	102.123	1.00	99.43
ATOM	990	CE	LYS	A	139	20.785	71.241	100.793	1.00	100.00
ATOM	991	NZ	LYS	A	139	21.686	70.402	99.978	1.00	100.00
ATOM	992	N	LEU	A	140	18.654	66.828	99.114	1.00	85.87
ATOM	993	CA	LEU	A	140	18.426	67.018	97.660	1.00	79.60
ATOM	994	C	LEU	A	140	18.772	68.392	97.043	1.00	75.62
ATOM	995	O	LEU	A	140	18.242	69.442	97.416	1.00	75.74
ATOM	996	CB	LEU	A	140	16.981	66.620	97.283	1.00	77.27
ATOM	997	CG	LEU	A	140	16.640	65.142	97.462	1.00	74.31
ATOM	998	CD1	LEU	A	140	17.569	64.263	96.645	1.00	73.21
ATOM	999	CD2	LEU	A	140	15.178	64.838	97.167	1.00	73.91
ATOM	1000	N	SER	A	141	19.713	68.357	96.067	1.00	70.08
ATOM	1001	CA	SER	A	141	19.868	69.619	95.320	1.00	64.86
ATOM	1002	C	SER	A	141	18.713	69.941	94.396	1.00	61.18
ATOM	1003	O	SER	A	141	18.189	69.080	93.708	1.00	61.77
ATOM	1004	CB	SER	A	141	21.127	69.682	94.461	1.00	64.49
ATOM	1005	OG	SER	A	141	21.354	71.028	94.002	1.00	66.43
ATOM	1006	N	LYS	A	142	18.349	71.235	94.379	1.00	57.81
ATOM	1007	CA	LYS	A	142	17.238	71.661	93.493	1.00	54.35
ATOM	1008	C	LYS	A	142	17.498	71.829	91.964	1.00	45.94
ATOM	1009	O	LYS	A	142	16.615	72.091	91.202	1.00	40.89
ATOM	1010	CB	LYS	A	142	16.631	72.953	94.061	1.00	57.69
ATOM	1011	CG	LYS	A	142	17.518	74.222	93.959	1.00	62.63
ATOM	1012	CD	LYS	A	142	16.625	75.420	93.545	1.00	68.07
ATOM	1013	CE	LYS	A	142	17.200	76.856	93.475	1.00	71.28
ATOM	1014	NZ	LYS	A	142	16.136	77.844	93.162	1.00	70.88
ATOM	1015	N	ASN	A	143	18.772	71.719	91.611	1.00	45.99
ATOM	1016	CA	ASN	A	143	19.527	72.392	90.538	1.00	44.71
ATOM	1017	C	ASN	A	143	20.592	71.481	89.878	1.00	42.57
ATOM	1018	O	ASN	A	143	20.794	70.322	90.283	1.00	40.17
ATOM	1019	CB	ASN	A	143	20.343	73.547	91.124	1.00	50.34
ATOM	1020	CG	ASN	A	143	19.624	74.818	90.876	1.00	55.19
ATOM	1021	OD1	ASN	A	143	18.441	74.944	91.098	1.00	59.21
ATOM	1022	ND2	ASN	A	143	20.366	75.786	90.389	1.00	59.88
ATOM	1023	N	GLY	A	144	21.265	72.084	88.819	1.00	39.72
ATOM	1024	CA	GLY	A	144	22.264	71.401	87.958	1.00	26.74
ATOM	1025	C	GLY	A	144	21.691	70.105	87.407	1.00	21.44
ATOM	1026	O	GLY	A	144	22.343	69.071	87.322	1.00	25.78

THIS PAGE BLANK (USPTO)

F I G. 2 9

ATOM	1027	N	SER A 145	20.380	70.181	87.105	1.00	19.15
ATOM	1028	CA	SER A 145	19.590	69.023	86.596	1.00	20.14
ATOM	1029	C	SER A 145	20.077	68.461	85.223	1.00	20.58
ATOM	1030	O	SER A 145	20.121	67.279	84.943	1.00	21.22
ATOM	1031	CB	SER A 145	18.171	69.499	86.338	1.00	18.89
ATOM	1032	OG	SER A 145	17.219	68.526	86.712	1.00	28.02
ATOM	1033	N	TYR A 146	20.531	69.419	84.399	1.00	22.70
ATOM	1034	CA	TYR A 146	20.867	69.170	82.968	1.00	19.51
ATOM	1035	C	TYR A 146	22.366	69.260	82.633	1.00	16.00
ATOM	1036	O	TYR A 146	22.930	70.339	82.736	1.00	17.85
ATOM	1037	CB	TYR A 146	20.097	70.216	82.114	1.00	18.79
ATOM	1038	CG	TYR A 146	20.211	69.933	80.600	1.00	20.29
ATOM	1039	CD1	TYR A 146	19.310	69.027	80.015	1.00	19.58
ATOM	1040	CD2	TYR A 146	21.205	70.582	79.824	1.00	20.42
ATOM	1041	CE1	TYR A 146	19.389	68.781	78.631	1.00	23.13
ATOM	1042	CE2	TYR A 146	21.287	70.337	78.424	1.00	21.68
ATOM	1043	CZ	TYR A 146	20.349	69.449	77.849	1.00	20.03
ATOM	1044	OH	TYR A 146	20.320	69.236	76.483	1.00	21.40
ATOM	1045	N	PRO A 147	22.994	68.144	82.187	1.00	16.52
ATOM	1046	CA	PRO A 147	22.385	66.793	82.188	1.00	17.87
ATOM	1047	C	PRO A 147	22.496	66.069	83.580	1.00	20.67
ATOM	1048	O	PRO A 147	23.198	66.531	84.480	1.00	22.35
ATOM	1049	CB	PRO A 147	23.250	66.107	81.122	1.00	15.36
ATOM	1050	CG	PRO A 147	24.649	66.716	81.297	1.00	15.06
ATOM	1051	CD	PRO A 147	24.356	68.168	81.630	1.00	16.28
ATOM	1052	N	SER A 148	21.827	64.908	83.662	1.00	18.73
ATOM	1053	CA	SER A 148	21.951	64.019	84.823	1.00	19.51
ATOM	1054	C	SER A 148	23.269	63.281	84.930	1.00	19.93
ATOM	1055	O	SER A 148	23.601	62.439	84.108	1.00	20.09
ATOM	1056	CB	SER A 148	20.828	62.997	84.807	1.00	18.55
ATOM	1057	OG	SER A 148	20.990	61.966	85.780	1.00	19.29
ATOM	1058	N	GLY A 149	24.036	63.618	85.972	1.00	18.26
ATOM	1059	CA	GLY A 149	25.284	62.888	86.231	1.00	16.00
ATOM	1060	C	GLY A 149	25.096	61.411	86.577	1.00	19.38
ATOM	1061	O	GLY A 149	25.791	60.549	86.044	1.00	21.04
ATOM	1062	N	HIS A 150	24.085	61.096	87.427	1.00	20.25
ATOM	1063	CA	HIS A 150	23.690	59.680	87.624	1.00	19.01
ATOM	1064	C	HIS A 150	23.381	58.861	86.330	1.00	19.93
ATOM	1065	O	HIS A 150	23.833	57.725	86.145	1.00	20.78
ATOM	1066	CB	HIS A 150	22.507	59.533	88.619	1.00	18.01
ATOM	1067	CG	HIS A 150	22.162	58.068	88.909	1.00	20.60
ATOM	1068	ND1	HIS A 150	22.864	57.235	89.730	1.00	23.41
ATOM	1069	CD2	HIS A 150	21.117	57.313	88.374	1.00	21.91
ATOM	1070	CE1	HIS A 150	22.287	55.996	89.732	1.00	22.83
ATOM	1071	NE2	HIS A 150	21.220	56.051	88.893	1.00	24.19
ATOM	1072	N	THR A 151	22.593	59.482	85.432	1.00	18.98
ATOM	1073	CA	THR A 151	22.325	58.814	84.132	1.00	17.17
ATOM	1074	C	THR A 151	23.548	58.652	83.228	1.00	13.61
ATOM	1075	O	THR A 151	23.814	57.594	82.659	1.00	17.00
ATOM	1076	CB	THR A 151	21.270	59.590	83.407	1.00	16.57
ATOM	1077	OG1	THR A 151	20.137	59.738	84.258	1.00	18.00
ATOM	1078	CG2	THR A 151	20.898	58.983	82.045	1.00	13.22
ATOM	1079	N	SER A 152	24.361	59.722	83.197	1.00	14.30
ATOM	1080	CA	SER A 152	25.687	59.598	82.557	1.00	15.99

THIS PAGE BLANK (USPTO)

3 2 / 4 7

F I G. 3 0

ATOM	1081	C	SER A 152	26.575	58.446	83.029	1.00	19.72
ATOM	1082	O	SER A 152	27.086	57.628	82.255	1.00	17.38
ATOM	1083	CB	SER A 152	26.434	60.927	82.644	1.00	12.58
ATOM	1084	OG	SER A 152	27.648	60.861	81.911	1.00	16.08
ATOM	1085	N	ILE A 153	26.662	58.340	84.403	1.00	20.60
ATOM	1086	CA	ILE A 153	27.272	57.121	85.017	1.00	16.15
ATOM	1087	C	ILE A 153	26.622	55.802	84.631	1.00	10.76
ATOM	1088	O	ILE A 153	27.293	54.850	84.262	1.00	14.38
ATOM	1089	CB	ILE A 153	27.384	57.170	86.608	1.00	15.02
ATOM	1090	CG1	ILE A 153	28.187	58.421	86.963	1.00	16.37
ATOM	1091	CG2	ILE A 153	28.154	55.944	87.164	1.00	12.98
ATOM	1092	CD1	ILE A 153	27.870	59.034	88.338	1.00	16.58
ATOM	1093	N	GLY A 154	25.285	55.763	84.720	1.00	9.72
ATOM	1094	CA	GLY A 154	24.662	54.476	84.397	1.00	13.63
ATOM	1095	C	GLY A 154	24.843	54.033	82.910	1.00	16.00
ATOM	1096	O	GLY A 154	25.022	52.866	82.571	1.00	16.37
ATOM	1097	N	TRP A 155	24.801	55.047	82.025	1.00	16.77
ATOM	1098	CA	TRP A 155	24.960	54.747	80.589	1.00	16.73
ATOM	1099	C	TRP A 155	26.378	54.351	80.200	1.00	15.90
ATOM	1100	O	TRP A 155	26.656	53.301	79.628	1.00	18.41
ATOM	1101	CB	TRP A 155	24.442	55.940	79.771	1.00	16.52
ATOM	1102	CG	TRP A 155	24.320	55.475	78.321	1.00	19.11
ATOM	1103	CD1	TRP A 155	25.009	56.015	77.210	1.00	18.94
ATOM	1104	CD2	TRP A 155	23.471	54.426	77.765	1.00	18.98
ATOM	1105	NE1	TRP A 155	24.679	55.352	76.044	1.00	17.77
ATOM	1106	CE2	TRP A 155	23.781	54.322	76.357	1.00	22.22
ATOM	1107	CE3	TRP A 155	22.585	53.486	78.337	1.00	19.43
ATOM	1108	CZ2	TRP A 155	23.084	53.377	75.564	1.00	17.99
ATOM	1109	CZ3	TRP A 155	21.913	52.538	77.537	1.00	19.46
ATOM	1110	CH2	TRP A 155	22.191	52.464	76.158	1.00	17.84
ATOM	1111	N	ALA A 156	27.299	55.209	80.623	1.00	15.37
ATOM	1112	CA	ALA A 156	28.702	54.836	80.515	1.00	14.36
ATOM	1113	C	ALA A 156	29.156	53.503	81.108	1.00	19.46
ATOM	1114	O	ALA A 156	29.895	52.723	80.528	1.00	19.86
ATOM	1115	CB	ALA A 156	29.564	55.918	81.136	1.00	15.83
ATOM	1116	N	THR A 157	28.651	53.207	82.327	1.00	19.95
ATOM	1117	CA	THR A 157	28.820	51.832	82.831	1.00	17.52
ATOM	1118	C	THR A 157	28.177	50.744	81.994	1.00	15.22
ATOM	1119	O	THR A 157	28.825	49.745	81.765	1.00	19.09
ATOM	1120	CB	THR A 157	28.328	51.667	84.291	1.00	14.92
ATOM	1121	OG1	THR A 157	28.932	52.679	85.054	1.00	18.29
ATOM	1122	CG2	THR A 157	28.620	50.327	84.944	1.00	13.21
ATOM	1123	N	ALA A 158	26.930	50.947	81.535	1.00	14.63
ATOM	1124	CA	ALA A 158	26.365	49.936	80.621	1.00	17.10
ATOM	1125	C	ALA A 158	27.213	49.686	79.354	1.00	15.52
ATOM	1126	O	ALA A 158	27.539	48.565	79.025	1.00	16.52
ATOM	1127	CB	ALA A 158	24.942	50.300	80.203	1.00	13.99
ATOM	1128	N	LEU A 159	27.655	50.766	78.705	1.00	17.91
ATOM	1129	CA	LEU A 159	28.613	50.615	77.580	1.00	17.69
ATOM	1130	C	LEU A 159	29.895	49.851	77.846	1.00	19.93
ATOM	1131	O	LEU A 159	30.277	48.954	77.092	1.00	19.21
ATOM	1132	CB	LEU A 159	28.959	51.971	76.939	1.00	14.08
ATOM	1133	CG	LEU A 159	27.744	52.759	76.396	1.00	11.97
ATOM	1134	CD1	LEU A 159	27.045	52.105	75.210	1.00	12.90

THIS PAGE BLANK (USPTO)

3 3 / 4 7

F I G. 3 1

ATOM	1135	CD2	LEU	A	159	28.177	54.158	76.046	1.00	12.40
ATOM	1136	N	VAL	A	160	30.547	50.181	79.014	1.00	21.70
ATOM	1137	CA	VAL	A	160	31.713	49.315	79.310	1.00	20.85
ATOM	1138	C	VAL	A	160	31.429	47.877	79.767	1.00	21.33
ATOM	1139	O	VAL	A	160	32.086	46.918	79.409	1.00	20.74
ATOM	1140	CB	VAL	A	160	32.574	50.032	80.367	1.00	21.59
ATOM	1141	CG1	VAL	A	160	33.518	49.143	81.174	1.00	20.11
ATOM	1142	CG2	VAL	A	160	33.299	51.307	79.977	1.00	20.10
ATOM	1143	N	LEU	A	161	30.351	47.711	80.542	1.00	21.86
ATOM	1144	CA	LEU	A	161	29.850	46.366	80.838	1.00	20.50
ATOM	1145	C	LEU	A	161	29.462	45.490	79.613	1.00	23.16
ATOM	1146	O	LEU	A	161	29.753	44.294	79.564	1.00	22.89
ATOM	1147	CB	LEU	A	161	28.623	46.472	81.733	1.00	18.65
ATOM	1148	CG	LEU	A	161	28.685	46.438	83.262	1.00	20.99
ATOM	1149	CD1	LEU	A	161	27.473	46.378	84.194	1.00	21.43
ATOM	1150	CD2	LEU	A	161	29.729	45.492	83.855	1.00	19.30
ATOM	1151	N	ALA	A	162	28.755	46.146	78.648	1.00	21.20
ATOM	1152	CA	ALA	A	162	28.384	45.496	77.361	1.00	19.14
ATOM	1153	C	ALA	A	162	29.591	44.948	76.586	1.00	17.15
ATOM	1154	O	ALA	A	162	29.620	43.812	76.133	1.00	20.85
ATOM	1155	CB	ALA	A	162	27.581	46.464	76.500	1.00	17.38
ATOM	1156	N	GLU	A	163	30.663	45.745	76.603	1.00	14.74
ATOM	1157	CA	GLU	A	163	31.962	45.262	76.118	1.00	17.48
ATOM	1158	C	GLU	A	163	32.648	44.080	76.824	1.00	22.07
ATOM	1159	O	GLU	A	163	33.271	43.216	76.227	1.00	23.96
ATOM	1160	CB	GLU	A	163	32.915	46.448	76.000	1.00	13.52
ATOM	1161	CG	GLU	A	163	34.227	46.018	75.359	1.00	13.04
ATOM	1162	CD	GLU	A	163	35.240	47.119	75.338	1.00	15.88
ATOM	1163	OE1	GLU	A	163	36.427	46.814	75.269	1.00	19.78
ATOM	1164	OE2	GLU	A	163	34.873	48.290	75.377	1.00	20.10
ATOM	1165	N	ILE	A	164	32.504	44.039	78.153	1.00	20.17
ATOM	1166	CA	ILE	A	164	32.996	42.869	78.905	1.00	18.72
ATOM	1167	C	ILE	A	164	32.164	41.609	78.757	1.00	17.39
ATOM	1168	O	ILE	A	164	32.635	40.481	78.674	1.00	20.44
ATOM	1169	CB	ILE	A	164	33.132	43.293	80.382	1.00	20.67
ATOM	1170	CG1	ILE	A	164	34.222	44.361	80.452	1.00	18.83
ATOM	1171	CG2	ILE	A	164	33.398	42.110	81.345	1.00	20.70
ATOM	1172	CD1	ILE	A	164	34.144	45.084	81.793	1.00	21.31
ATOM	1173	N	ASN	A	165	30.869	41.846	78.704	1.00	18.41
ATOM	1174	CA	ASN	A	165	29.979	40.712	78.524	1.00	21.36
ATOM	1175	C	ASN	A	165	28.957	40.867	77.375	1.00	23.74
ATOM	1176	O	ASN	A	165	27.753	40.988	77.563	1.00	23.14
ATOM	1177	CB	ASN	A	165	29.324	40.404	79.878	1.00	21.69
ATOM	1178	CG	ASN	A	165	28.471	39.156	79.861	1.00	25.72
ATOM	1179	OD1	ASN	A	165	28.469	38.307	78.967	1.00	29.37
ATOM	1180	ND2	ASN	A	165	27.730	39.051	80.951	1.00	27.39
ATOM	1181	N	PRO	A	166	29.466	40.814	76.118	1.00	25.93
ATOM	1182	CA	PRO	A	166	28.556	40.971	74.957	1.00	26.27
ATOM	1183	C	PRO	A	166	27.447	39.924	74.837	1.00	24.06
ATOM	1184	O	PRO	A	166	26.361	40.184	74.360	1.00	24.11
ATOM	1185	CB	PRO	A	166	29.517	41.040	73.781	1.00	25.15
ATOM	1186	CG	PRO	A	166	30.731	40.254	74.255	1.00	27.68
ATOM	1187	CD	PRO	A	166	30.849	40.613	75.728	1.00	24.89
ATOM	1188	N	GLN	A	167	27.679	38.741	75.385	1.00	25.15

THIS PAGE BLANK (USPTO)

F I G. 3 2

ATOM	1189	CA	GLN	A	167	26.552	37.804	75.508	1.00	27.09
ATOM	1190	C	GLN	A	167	25.275	38.321	76.189	1.00	25.06
ATOM	1191	O	GLN	A	167	24.162	37.932	75.883	1.00	23.75
ATOM	1192	CB	GLN	A	167	27.080	36.617	76.282	1.00	35.50
ATOM	1193	CG	GLN	A	167	27.386	35.380	75.468	1.00	52.12
ATOM	1194	CD	GLN	A	167	26.074	34.747	75.000	1.00	65.78
ATOM	1195	OE1	GLN	A	167	25.950	34.245	73.889	1.00	72.02
ATOM	1196	NE2	GLN	A	167	25.047	34.780	75.867	1.00	71.50
ATOM	1197	N	ARG	A	168	25.513	39.242	77.156	1.00	26.04
ATOM	1198	CA	ARG	A	168	24.389	39.900	77.837	1.00	25.63
ATOM	1199	C	ARG	A	168	24.242	41.368	77.558	1.00	23.88
ATOM	1200	O	ARG	A	168	23.632	42.106	78.308	1.00	24.09
ATOM	1201	CB	ARG	A	168	24.452	39.638	79.337	1.00	24.63
ATOM	1202	CG	ARG	A	168	24.087	38.171	79.408	1.00	25.72
ATOM	1203	CD	ARG	A	168	23.986	37.617	80.802	1.00	33.72
ATOM	1204	NE	ARG	A	168	22.970	38.302	81.587	1.00	35.38
ATOM	1205	CZ	ARG	A	168	21.729	37.877	81.680	1.00	35.91
ATOM	1206	NH1	ARG	A	168	20.908	38.482	82.490	1.00	34.99
ATOM	1207	NH2	ARG	A	168	21.314	36.867	80.975	1.00	39.28
ATOM	1208	N	GLN	A	169	24.838	41.810	76.424	1.00	23.22
ATOM	1209	CA	GLN	A	169	24.820	43.228	76.080	1.00	19.99
ATOM	1210	C	GLN	A	169	23.441	43.850	76.067	1.00	21.38
ATOM	1211	O	GLN	A	169	23.216	44.969	76.492	1.00	24.60
ATOM	1212	CB	GLN	A	169	25.571	43.510	74.769	1.00	22.07
ATOM	1213	CG	GLN	A	169	24.970	42.878	73.494	1.00	20.93
ATOM	1214	CD	GLN	A	169	25.716	43.287	72.207	1.00	23.42
ATOM	1215	OE1	GLN	A	169	26.680	44.055	72.202	1.00	24.82
ATOM	1216	NE2	GLN	A	169	25.186	42.738	71.109	1.00	13.86
ATOM	1217	N	ASN	A	170	22.455	43.089	75.600	1.00	20.48
ATOM	1218	CA	ASN	A	170	21.138	43.736	75.525	1.00	20.97
ATOM	1219	C	ASN	A	170	20.484	44.007	76.892	1.00	19.73
ATOM	1220	O	ASN	A	170	19.852	45.020	77.128	1.00	18.90
ATOM	1221	CB	ASN	A	170	20.195	42.930	74.595	1.00	24.43
ATOM	1222	CG	ASN	A	170	20.763	42.881	73.153	1.00	25.82
ATOM	1223	OD1	ASN	A	170	20.842	43.862	72.440	1.00	26.22
ATOM	1224	ND2	ASN	A	170	21.197	41.709	72.734	1.00	25.47
ATOM	1225	N	GLU	A	171	20.680	43.042	77.790	1.00	21.27
ATOM	1226	CA	GLU	A	171	20.166	43.146	79.157	1.00	19.84
ATOM	1227	C	GLU	A	171	20.849	44.220	79.926	1.00	16.23
ATOM	1228	O	GLU	A	171	20.199	45.026	80.575	1.00	20.87
ATOM	1229	CB	GLU	A	171	20.317	41.822	79.892	1.00	20.47
ATOM	1230	CG	GLU	A	171	19.412	40.750	79.312	1.00	24.15
ATOM	1231	CD	GLU	A	171	20.157	39.825	78.376	1.00	26.37
ATOM	1232	OE1	GLU	A	171	21.076	40.256	77.685	1.00	23.54
ATOM	1233	OE2	GLU	A	171	19.801	38.645	78.363	1.00	32.14
ATOM	1234	N	ILE	A	172	22.169	44.236	79.751	1.00	17.53
ATOM	1235	CA	ILE	A	172	23.029	45.318	80.257	1.00	16.90
ATOM	1236	C	ILE	A	172	22.679	46.733	79.813	1.00	20.21
ATOM	1237	O	ILE	A	172	22.454	47.636	80.617	1.00	18.91
ATOM	1238	CB	ILE	A	172	24.507	44.992	79.956	1.00	17.00
ATOM	1239	CG1	ILE	A	172	25.000	43.685	80.613	1.00	15.78
ATOM	1240	CG2	ILE	A	172	25.426	46.163	80.300	1.00	18.13
ATOM	1241	CD1	ILE	A	172	26.426	43.320	80.163	1.00	13.83
ATOM	1242	N	LEU	A	173	22.575	46.909	78.468	1.00	20.75

THIS PAGE BLANK (USPTO)

35 / 47

FIG. 33

ATOM	1243	CA	LEU A 173	22.107	48.206	77.946	1.00	17.70
ATOM	1244	C	LEU A 173	20.699	48.622	78.396	1.00	16.26
ATOM	1245	O	LEU A 173	20.376	49.774	78.663	1.00	18.18
ATOM	1246	CB	LEU A 173	22.176	48.201	76.419	1.00	16.81
ATOM	1247	CG	LEU A 173	23.600	48.021	75.966	1.00	18.73
ATOM	1248	CD1	LEU A 173	24.410	49.282	76.138	1.00	16.97
ATOM	1249	CD2	LEU A 173	23.619	47.550	74.505	1.00	23.91
ATOM	1250	N	LYS A 174	19.835	47.625	78.475	1.00	15.86
ATOM	1251	CA	LYS A 174	18.494	47.970	78.945	1.00	19.21
ATOM	1252	C	LYS A 174	18.453	48.415	80.429	1.00	21.86
ATOM	1253	O	LYS A 174	17.800	49.404	80.737	1.00	20.00
ATOM	1254	CB	LYS A 174	17.577	46.773	78.700	1.00	20.19
ATOM	1255	CG	LYS A 174	16.094	47.130	78.731	1.00	27.84
ATOM	1256	CD	LYS A 174	15.799	48.368	77.858	1.00	36.14
ATOM	1257	CE	LYS A 174	14.309	48.628	77.774	1.00	40.56
ATOM	1258	NZ	LYS A 174	13.775	48.622	79.156	1.00	49.45
ATOM	1259	N	ARG A 175	19.250	47.698	81.286	1.00	21.93
ATOM	1260	CA	ARG A 175	19.476	48.145	82.686	1.00	19.65
ATOM	1261	C	ARG A 175	20.037	49.561	82.807	1.00	16.70
ATOM	1262	O	ARG A 175	19.476	50.419	83.468	1.00	18.12
ATOM	1263	CB	ARG A 175	20.345	47.126	83.467	1.00	21.25
ATOM	1264	CG	ARG A 175	20.608	47.477	84.954	1.00	22.00
ATOM	1265	CD	ARG A 175	19.259	47.669	85.656	1.00	25.63
ATOM	1266	NE	ARG A 175	19.435	47.923	87.095	1.00	29.77
ATOM	1267	CZ	ARG A 175	18.601	48.672	87.834	1.00	27.58
ATOM	1268	NH1	ARG A 175	17.550	49.301	87.355	1.00	24.74
ATOM	1269	NH2	ARG A 175	18.792	48.780	89.073	1.00	27.45
ATOM	1270	N	GLY A 176	21.122	49.800	82.048	1.00	17.53
ATOM	1271	CA	GLY A 176	21.698	51.143	81.893	1.00	17.18
ATOM	1272	C	GLY A 176	20.679	52.214	81.552	1.00	21.18
ATOM	1273	O	GLY A 176	20.582	53.278	82.149	1.00	21.85
ATOM	1274	N	TYR A 177	19.847	51.887	80.547	1.00	22.48
ATOM	1275	CA	TYR A 177	18.756	52.787	80.117	1.00	20.51
ATOM	1276	C	TYR A 177	17.754	53.106	81.242	1.00	18.92
ATOM	1277	O	TYR A 177	17.406	54.246	81.542	1.00	15.84
ATOM	1278	CB	TYR A 177	18.007	52.120	78.939	1.00	23.76
ATOM	1279	CG	TYR A 177	17.210	53.131	78.177	1.00	24.47
ATOM	1280	CD1	TYR A 177	15.817	53.306	78.397	1.00	26.61
ATOM	1281	CD2	TYR A 177	17.941	53.869	77.236	1.00	29.40
ATOM	1282	CE1	TYR A 177	15.139	54.308	77.661	1.00	29.08
ATOM	1283	CE2	TYR A 177	17.270	54.855	76.515	1.00	30.70
ATOM	1284	CZ	TYR A 177	15.899	55.092	76.747	1.00	32.01
ATOM	1285	OH	TYR A 177	15.401	56.167	76.020	1.00	41.52
ATOM	1286	N	GLU A 178	17.354	52.008	81.867	1.00	19.45
ATOM	1287	CA	GLU A 178	16.429	52.094	82.972	1.00	22.02
ATOM	1288	C	GLU A 178	16.820	52.802	84.236	1.00	20.09
ATOM	1289	O	GLU A 178	16.001	53.492	84.805	1.00	21.41
ATOM	1290	CB	GLU A 178	16.010	50.731	83.357	1.00	25.45
ATOM	1291	CG	GLU A 178	15.173	50.032	82.303	1.00	34.73
ATOM	1292	CD	GLU A 178	13.893	50.810	81.951	1.00	40.36
ATOM	1293	OE1	GLU A 178	13.432	51.667	82.707	1.00	33.51
ATOM	1294	OE2	GLU A 178	13.352	50.556	80.876	1.00	45.77
ATOM	1295	N	LEU A 179	18.090	52.695	84.609	1.00	19.63
ATOM	1296	CA	LEU A 179	18.655	53.567	85.665	1.00	19.10

THIS PAGE BLANK (USPTO)

3 6 / 4 7

F I G. 3 4

ATOM	1297	C	LEU A 179	18.366	55.051	85.511	1.00	20.25
ATOM	1298	O	LEU A 179	17.838	55.726	86.374	1.00	19.26
ATOM	1299	CB	LEU A 179	20.178	53.361	85.813	1.00	17.45
ATOM	1300	CG	LEU A 179	20.610	52.013	86.426	1.00	18.23
ATOM	1301	CD1	LEU A 179	20.093	51.829	87.873	1.00	16.98
ATOM	1302	CD2	LEU A 179	22.124	51.811	86.340	1.00	16.34
ATOM	1303	N	GLY A 180	18.647	55.545	84.290	1.00	19.84
ATOM	1304	CA	GLY A 180	18.171	56.903	83.987	1.00	15.90
ATOM	1305	C	GLY A 180	16.655	57.072	84.027	1.00	17.05
ATOM	1306	O	GLY A 180	16.130	58.031	84.564	1.00	19.49
ATOM	1307	N	GLN A 181	15.923	56.068	83.478	1.00	18.19
ATOM	1308	CA	GLN A 181	14.448	56.207	83.522	1.00	17.92
ATOM	1309	C	GLN A 181	13.822	56.265	84.938	1.00	18.20
ATOM	1310	O	GLN A 181	12.903	57.008	85.258	1.00	19.66
ATOM	1311	CB	GLN A 181	13.716	55.189	82.620	1.00	15.39
ATOM	1312	CG	GLN A 181	13.936	55.324	81.073	1.00	15.18
ATOM	1313	CD	GLN A 181	13.823	56.763	80.634	1.00	13.30
ATOM	1314	OE1	GLN A 181	14.769	57.400	80.176	1.00	17.23
ATOM	1315	NE2	GLN A 181	12.626	57.300	80.812	1.00	12.82
ATOM	1316	N	SER A 182	14.440	55.497	85.821	1.00	20.03
ATOM	1317	CA	SER A 182	14.156	55.600	87.273	1.00	16.56
ATOM	1318	C	SER A 182	14.209	56.973	87.871	1.00	14.78
ATOM	1319	O	SER A 182	13.305	57.369	88.582	1.00	19.49
ATOM	1320	CB	SER A 182	15.056	54.630	88.021	1.00	15.31
ATOM	1321	OG	SER A 182	14.563	53.332	87.714	1.00	16.70
ATOM	1322	N	ARG A 183	15.246	57.738	87.523	1.00	16.99
ATOM	1323	CA	ARG A 183	15.289	59.169	87.858	1.00	15.54
ATOM	1324	C	ARG A 183	14.161	60.085	87.309	1.00	19.55
ATOM	1325	O	ARG A 183	13.693	61.039	87.956	1.00	17.04
ATOM	1326	CB	ARG A 183	16.661	59.785	87.569	1.00	14.08
ATOM	1327	CG	ARG A 183	17.811	59.024	88.265	1.00	19.49
ATOM	1328	CD	ARG A 183	17.716	59.007	89.816	1.00	21.46
ATOM	1329	NE	ARG A 183	18.519	57.930	90.434	1.00	22.16
ATOM	1330	CZ	ARG A 183	19.509	58.121	91.300	1.00	19.15
ATOM	1331	NH1	ARG A 183	19.913	59.335	91.541	1.00	16.50
ATOM	1332	NH2	ARG A 183	20.042	57.081	91.914	1.00	18.34
ATOM	1333	N	VAL A 184	13.681	59.704	86.076	1.00	21.38
ATOM	1334	CA	VAL A 184	12.494	60.417	85.589	1.00	19.02
ATOM	1335	C	VAL A 184	11.194	60.051	86.301	1.00	16.98
ATOM	1336	O	VAL A 184	10.468	60.913	86.800	1.00	18.45
ATOM	1337	CB	VAL A 184	12.368	60.194	84.070	1.00	19.28
ATOM	1338	CG1	VAL A 184	11.057	60.717	83.486	1.00	17.84
ATOM	1339	CG2	VAL A 184	13.517	60.605	83.169	1.00	15.69
ATOM	1340	N	ILE A 185	10.977	58.734	86.408	1.00	17.32
ATOM	1341	CA	ILE A 185	9.834	58.241	87.202	1.00	21.14
ATOM	1342	C	ILE A 185	9.790	58.797	88.672	1.00	22.77
ATOM	1343	O	ILE A 185	8.749	59.230	89.142	1.00	22.95
ATOM	1344	CB	ILE A 185	9.810	56.695	87.193	1.00	20.65
ATOM	1345	CG1	ILE A 185	9.555	56.195	85.758	1.00	18.43
ATOM	1346	CG2	ILE A 185	8.776	56.133	88.202	1.00	18.29
ATOM	1347	CD1	ILE A 185	9.914	54.734	85.494	1.00	14.60
ATOM	1348	N	CYS A 186	10.976	58.837	89.332	1.00	20.34
ATOM	1349	CA	CYS A 186	11.005	59.262	90.745	1.00	21.26
ATOM	1350	C	CYS A 186	10.979	60.766	90.931	1.00	22.80

THIS PAGE BLANK (USPTO)

37 / 47

F I G. 35

ATOM	1351	O	CYS A 186	10.775	61.304	92.009	1.00	23.98
ATOM	1352	CB	CYS A 186	12.220	58.669	91.429	1.00	21.60
ATOM	1353	SG	CYS A 186	12.075	58.576	93.237	1.00	25.16
ATOM	1354	N	GLY A 187	11.149	61.494	89.814	1.00	20.34
ATOM	1355	CA	GLY A 187	11.023	62.949	89.981	1.00	13.75
ATOM	1356	C	GLY A 187	12.351	63.676	90.197	1.00	14.55
ATOM	1357	O	GLY A 187	12.436	64.871	90.453	1.00	16.08
ATOM	1358	N	TYR A 188	13.434	62.894	90.072	1.00	14.86
ATOM	1359	CA	TYR A 188	14.736	63.526	90.226	1.00	16.85
ATOM	1360	C	TYR A 188	15.214	64.366	89.046	1.00	20.24
ATOM	1361	O	TYR A 188	15.979	65.318	89.192	1.00	18.42
ATOM	1362	CB	TYR A 188	15.758	62.441	90.479	1.00	21.64
ATOM	1363	CG	TYR A 188	15.683	61.913	91.899	1.00	27.20
ATOM	1364	CD1	TYR A 188	16.748	62.226	92.737	1.00	32.00
ATOM	1365	CD2	TYR A 188	14.604	61.128	92.365	1.00	30.81
ATOM	1366	CE1	TYR A 188	16.727	61.784	94.071	1.00	35.38
ATOM	1367	CE2	TYR A 188	14.570	60.695	93.705	1.00	30.65
ATOM	1368	CZ	TYR A 188	15.624	61.071	94.556	1.00	35.88
ATOM	1369	OH	TYR A 188	15.607	60.787	95.912	1.00	41.39
ATOM	1370	N	HIS A 189	14.751	63.890	87.862	1.00	19.35
ATOM	1371	CA	HIS A 189	15.215	64.475	86.589	1.00	19.83
ATOM	1372	C	HIS A 189	14.108	64.550	85.551	1.00	16.85
ATOM	1373	O	HIS A 189	13.232	63.689	85.533	1.00	18.10
ATOM	1374	CB	HIS A 189	16.360	63.648	86.032	1.00	15.43
ATOM	1375	CG	HIS A 189	17.677	64.142	86.589	1.00	16.05
ATOM	1376	ND1	HIS A 189	18.154	65.384	86.414	1.00	17.24
ATOM	1377	CD2	HIS A 189	18.581	63.433	87.382	1.00	17.58
ATOM	1378	CE1	HIS A 189	19.347	65.503	87.080	1.00	16.38
ATOM	1379	NE2	HIS A 189	19.587	64.304	87.667	1.00	18.68
ATOM	1380	N	TRP A 190	14.183	65.611	84.723	1.00	18.99
ATOM	1381	CA	TRP A 190	13.341	65.719	83.490	1.00	17.22
ATOM	1382	C	TRP A 190	13.768	64.690	82.453	1.00	15.79
ATOM	1383	O	TRP A 190	14.942	64.354	82.416	1.00	15.77
ATOM	1384	CB	TRP A 190	13.502	67.102	82.855	1.00	16.12
ATOM	1385	CG	TRP A 190	13.134	68.178	83.857	1.00	12.39
ATOM	1386	CD1	TRP A 190	14.033	69.073	84.454	1.00	10.88
ATOM	1387	CD2	TRP A 190	11.800	68.581	84.295	1.00	14.35
ATOM	1388	NE1	TRP A 190	13.343	69.989	85.186	1.00	13.77
ATOM	1389	CE2	TRP A 190	11.976	69.731	85.141	1.00	10.71
ATOM	1390	CE3	TRP A 190	10.505	68.036	84.094	1.00	14.68
ATOM	1391	CZ2	TRP A 190	10.845	70.401	85.666	1.00	12.89
ATOM	1392	CZ3	TRP A 190	9.393	68.700	84.672	1.00	16.93
ATOM	1393	CH2	TRP A 190	9.557	69.875	85.441	1.00	12.82
ATOM	1394	N	GLN A 191	12.859	64.188	81.613	1.00	16.92
ATOM	1395	CA	GLN A 191	13.316	63.234	80.569	1.00	17.49
ATOM	1396	C	GLN A 191	14.519	63.720	79.696	1.00	15.64
ATOM	1397	O	GLN A 191	15.508	63.054	79.429	1.00	16.52
ATOM	1398	CB	GLN A 191	12.113	62.829	79.721	1.00	15.28
ATOM	1399	CG	GLN A 191	12.522	61.832	78.632	1.00	17.26
ATOM	1400	CD	GLN A 191	12.860	60.493	79.206	1.00	16.84
ATOM	1401	OE1	GLN A 191	12.086	59.920	79.946	1.00	21.21
ATOM	1402	NE2	GLN A 191	14.027	59.971	78.864	1.00	16.69
ATOM	1403	N	SER A 192	14.448	65.016	79.389	1.00	17.04
ATOM	1404	CA	SER A 192	15.564	65.622	78.666	1.00	15.81

THIS PAGE BLANK (USPTO)

38 / 47

FIG. 36

ATOM	1405	C	SER A 192	16.899	65.683	79.339	1.00	17.61
ATOM	1406	O	SER A 192	17.937	65.640	78.700	1.00	16.65
ATOM	1407	CB	SER A 192	15.209	67.005	78.211	1.00	15.87
ATOM	1408	OG	SER A 192	14.862	67.833	79.313	1.00	21.12
ATOM	1409	N	ASP A 193	16.886	65.712	80.681	1.00	17.44
ATOM	1410	CA	ASP A 193	18.190	65.648	81.360	1.00	15.23
ATOM	1411	C	ASP A 193	18.889	64.316	81.197	1.00	12.26
ATOM	1412	O	ASP A 193	20.113	64.204	81.054	1.00	14.16
ATOM	1413	CB	ASP A 193	18.036	65.832	82.887	1.00	16.01
ATOM	1414	CG	ASP A 193	17.367	67.116	83.311	1.00	14.57
ATOM	1415	OD1	ASP A 193	17.503	68.180	82.691	1.00	15.89
ATOM	1416	OD2	ASP A 193	16.673	67.038	84.312	1.00	19.14
ATOM	1417	N	VAL A 194	18.025	63.283	81.216	1.00	11.48
ATOM	1418	CA	VAL A 194	18.425	61.882	81.108	1.00	13.18
ATOM	1419	C	VAL A 194	18.851	61.478	79.663	1.00	15.63
ATOM	1420	O	VAL A 194	19.852	60.822	79.387	1.00	15.79
ATOM	1421	CB	VAL A 194	17.210	61.135	81.625	1.00	16.33
ATOM	1422	CG1	VAL A 194	17.152	61.202	83.184	1.00	19.26
ATOM	1423	CG2	VAL A 194	17.079	59.712	81.106	1.00	17.70
ATOM	1424	N	ASP A 195	18.050	61.992	78.728	1.00	16.54
ATOM	1425	CA	ASP A 195	18.488	61.921	77.332	1.00	16.55
ATOM	1426	C	ASP A 195	19.801	62.636	77.029	1.00	14.74
ATOM	1427	O	ASP A 195	20.758	62.076	76.519	1.00	18.92
ATOM	1428	CB	ASP A 195	17.367	62.455	76.477	1.00	15.91
ATOM	1429	CG	ASP A 195	16.139	61.563	76.560	1.00	19.86
ATOM	1430	OD1	ASP A 195	16.153	60.385	76.922	1.00	27.62
ATOM	1431	OD2	ASP A 195	15.090	62.069	76.264	1.00	26.20
ATOM	1432	N	ALA A 196	19.902	63.900	77.450	1.00	15.85
ATOM	1433	CA	ALA A 196	21.203	64.555	77.312	1.00	14.73
ATOM	1434	C	ALA A 196	22.383	63.806	77.932	1.00	18.85
ATOM	1435	O	ALA A 196	23.512	63.751	77.429	1.00	21.06
ATOM	1436	CB	ALA A 196	21.134	65.950	77.904	1.00	13.59
ATOM	1437	N	ALA A 197	22.056	63.177	79.091	1.00	19.14
ATOM	1438	CA	ALA A 197	23.098	62.442	79.808	1.00	17.62
ATOM	1439	C	ALA A 197	23.644	61.202	79.090	1.00	17.71
ATOM	1440	O	ALA A 197	24.851	60.931	79.104	1.00	18.18
ATOM	1441	CB	ALA A 197	22.587	62.002	81.181	1.00	15.91
ATOM	1442	N	ARG A 198	22.711	60.477	78.418	1.00	16.04
ATOM	1443	CA	ARG A 198	23.238	59.409	77.565	1.00	15.41
ATOM	1444	C	ARG A 198	24.179	59.843	76.413	1.00	14.99
ATOM	1445	O	ARG A 198	25.194	59.219	76.113	1.00	17.07
ATOM	1446	CB	ARG A 198	22.136	58.469	77.080	1.00	14.50
ATOM	1447	CG	ARG A 198	21.195	58.043	78.179	1.00	16.67
ATOM	1448	CD	ARG A 198	20.142	57.044	77.730	1.00	19.20
ATOM	1449	NE	ARG A 198	19.280	56.629	78.849	1.00	22.72
ATOM	1450	CZ	ARG A 198	18.003	57.012	79.061	1.00	22.30
ATOM	1451	NH1	ARG A 198	17.412	57.905	78.325	1.00	20.95
ATOM	1452	NH2	ARG A 198	17.292	56.518	80.045	1.00	21.57
ATOM	1453	N	VAL A 199	23.907	61.030	75.842	1.00	17.69
ATOM	1454	CA	VAL A 199	24.961	61.510	74.913	1.00	17.44
ATOM	1455	C	VAL A 199	26.376	61.736	75.457	1.00	18.48
ATOM	1456	O	VAL A 199	27.360	61.145	74.988	1.00	19.25
ATOM	1457	CB	VAL A 199	24.452	62.820	74.284	1.00	15.93
ATOM	1458	CG1	VAL A 199	25.350	63.540	73.279	1.00	11.45

THIS PAGE BLANK (USPTO)

FIG. 37

39/47

ATOM	1459	CG2	VAL	A	199	23.072	62.640	73.680	1.00	15.33
ATOM	1460	N	VAL	A	200	26.471	62.548	76.550	1.00	18.52
ATOM	1461	CA	VAL	A	200	27.822	62.723	77.153	1.00	16.27
ATOM	1462	C	VAL	A	200	28.442	61.461	77.794	1.00	14.37
ATOM	1463	O	VAL	A	200	29.643	61.247	77.797	1.00	17.25
ATOM	1464	CB	VAL	A	200	27.811	63.938	78.100	1.00	16.56
ATOM	1465	CG1	VAL	A	200	26.761	63.894	79.246	1.00	13.52
ATOM	1466	CG2	VAL	A	200	27.666	65.177	77.226	1.00	17.14
ATOM	1467	N	GLY	A	201	27.556	60.570	78.283	1.00	14.98
ATOM	1468	CA	GLY	A	201	27.998	59.297	78.836	1.00	13.20
ATOM	1469	C	GLY	A	201	28.609	58.377	77.824	1.00	16.81
ATOM	1470	O	GLY	A	201	29.588	57.701	78.067	1.00	17.03
ATOM	1471	N	SER	A	202	28.034	58.413	76.614	1.00	17.82
ATOM	1472	CA	SER	A	202	28.757	57.750	75.509	1.00	16.70
ATOM	1473	C	SER	A	202	30.087	58.390	75.104	1.00	13.91
ATOM	1474	O	SER	A	202	31.117	57.765	74.939	1.00	18.47
ATOM	1475	CB	SER	A	202	27.813	57.511	74.303	1.00	15.94
ATOM	1476	OG	SER	A	202	27.634	58.737	73.600	1.00	19.26
ATOM	1477	N	ALA	A	203	30.094	59.719	75.030	1.00	14.76
ATOM	1478	CA	ALA	A	203	31.333	60.383	74.641	1.00	14.41
ATOM	1479	C	ALA	A	203	32.527	60.110	75.563	1.00	17.92
ATOM	1480	O	ALA	A	203	33.652	59.803	75.177	1.00	16.36
ATOM	1481	CB	ALA	A	203	31.042	61.872	74.572	1.00	13.61
ATOM	1482	N	VAL	A	204	32.200	60.126	76.880	1.00	18.27
ATOM	1483	CA	VAL	A	204	33.290	59.835	77.823	1.00	16.45
ATOM	1484	C	VAL	A	204	33.834	58.394	77.718	1.00	13.88
ATOM	1485	O	VAL	A	204	35.015	58.177	77.916	1.00	17.64
ATOM	1486	CB	VAL	A	204	32.893	60.245	79.285	1.00	16.63
ATOM	1487	CG1	VAL	A	204	34.131	60.323	80.177	1.00	16.51
ATOM	1488	CG2	VAL	A	204	31.836	59.301	79.862	1.00	13.53
ATOM	1489	N	VAL	A	205	32.971	57.392	77.355	1.00	15.31
ATOM	1490	CA	VAL	A	205	33.648	56.100	77.152	1.00	17.30
ATOM	1491	C	VAL	A	205	34.636	56.018	75.953	1.00	19.20
ATOM	1492	O	VAL	A	205	35.644	55.311	76.002	1.00	19.08
ATOM	1493	CB	VAL	A	205	32.563	55.014	77.035	1.00	19.10
ATOM	1494	CG1	VAL	A	205	32.812	53.549	76.681	1.00	16.51
ATOM	1495	CG2	VAL	A	205	31.797	55.088	78.343	1.00	17.27
ATOM	1496	N	ALA	A	206	34.409	56.893	74.934	1.00	21.03
ATOM	1497	CA	ALA	A	206	35.452	57.018	73.888	1.00	19.17
ATOM	1498	C	ALA	A	206	36.765	57.498	74.469	1.00	19.27
ATOM	1499	O	ALA	A	206	37.809	56.868	74.353	1.00	18.59
ATOM	1500	CB	ALA	A	206	34.982	57.988	72.809	1.00	16.60
ATOM	1501	N	THR	A	207	36.643	58.597	75.234	1.00	20.20
ATOM	1502	CA	THR	A	207	37.873	59.078	75.903	1.00	20.52
ATOM	1503	C	THR	A	207	38.613	58.126	76.838	1.00	21.84
ATOM	1504	O	THR	A	207	39.831	58.030	76.898	1.00	23.45
ATOM	1505	CB	THR	A	207	37.659	60.341	76.674	1.00	19.84
ATOM	1506	OG1	THR	A	207	36.577	61.100	76.137	1.00	20.11
ATOM	1507	CG2	THR	A	207	38.945	61.141	76.710	1.00	21.15
ATOM	1508	N	LEU	A	208	37.806	57.345	77.574	1.00	23.89
ATOM	1509	CA	LEU	A	208	38.323	56.332	78.510	1.00	22.19
ATOM	1510	C	LEU	A	208	39.165	55.285	77.783	1.00	25.28
ATOM	1511	O	LEU	A	208	40.232	54.880	78.228	1.00	24.41
ATOM	1512	CB	LEU	A	208	37.170	55.700	79.312	1.00	21.93

THIS PAGE BLANK (USPTO)

40 / 47

FIG. 38

ATOM	1513	CG	LEU A 208	36.238	56.370	80.325	1.00	24.99
ATOM	1514	CD1	LEU A 208	35.117	55.631	81.058	1.00	26.55
ATOM	1515	CD2	LEU A 208	37.303	56.685	81.377	1.00	22.67
ATOM	1516	N	HIS A 209	38.666	54.873	76.588	1.00	24.64
ATOM	1517	CA	HIS A 209	39.495	53.970	75.766	1.00	20.81
ATOM	1518	C	HIS A 209	40.863	54.530	75.277	1.00	19.15
ATOM	1519	O	HIS A 209	41.807	53.872	74.934	1.00	20.30
ATOM	1520	CB	HIS A 209	38.656	53.449	74.595	1.00	16.87
ATOM	1521	CG	HIS A 209	37.588	52.476	74.994	1.00	13.42
ATOM	1522	ND1	HIS A 209	36.335	52.782	75.375	1.00	14.12
ATOM	1523	CD2	HIS A 209	37.686	51.099	74.975	1.00	12.37
ATOM	1524	CE1	HIS A 209	35.653	51.616	75.586	1.00	10.36
ATOM	1525	NE2	HIS A 209	36.493	50.590	75.334	1.00	13.53
ATOM	1526	N	THR A 210	41.035	55.827	75.336	1.00	20.82
ATOM	1527	CA	THR A 210	42.393	56.384	75.116	1.00	21.40
ATOM	1528	C	THR A 210	43.396	56.387	76.298	1.00	26.34
ATOM	1529	O	THR A 210	44.567	56.745	76.188	1.00	27.83
ATOM	1530	CB	THR A 210	42.315	57.836	74.662	1.00	22.02
ATOM	1531	OG1	THR A 210	42.096	58.723	75.795	1.00	25.04
ATOM	1532	CG2	THR A 210	41.307	58.070	73.528	1.00	20.46
ATOM	1533	N	ASN A 211	42.844	56.032	77.482	1.00	26.32
ATOM	1534	CA	ASN A 211	43.544	56.135	78.782	1.00	23.64
ATOM	1535	C	ASN A 211	44.212	54.824	79.204	1.00	20.62
ATOM	1536	O	ASN A 211	43.591	53.785	79.374	1.00	22.28
ATOM	1537	CB	ASN A 211	42.563	56.749	79.827	1.00	24.99
ATOM	1538	CG	ASN A 211	43.226	56.863	81.206	1.00	24.09
ATOM	1539	OD1	ASN A 211	43.320	55.886	81.935	1.00	25.25
ATOM	1540	ND2	ASN A 211	43.689	58.038	81.566	1.00	21.24
ATOM	1541	N	PRO A 212	45.563	54.884	79.353	1.00	22.01
ATOM	1542	CA	PRO A 212	46.337	53.660	79.633	1.00	21.52
ATOM	1543	C	PRO A 212	45.859	52.883	80.848	1.00	22.52
ATOM	1544	O	PRO A 212	45.670	51.673	80.882	1.00	22.12
ATOM	1545	CB	PRO A 212	47.743	54.190	79.845	1.00	22.52
ATOM	1546	CG	PRO A 212	47.805	55.535	79.117	1.00	25.40
ATOM	1547	CD	PRO A 212	46.391	56.076	79.175	1.00	22.01
ATOM	1548	N	ALA A 213	45.626	53.674	81.897	1.00	23.96
ATOM	1549	CA	ALA A 213	45.139	53.025	83.140	1.00	23.57
ATOM	1550	C	ALA A 213	43.797	52.337	83.019	1.00	21.76
ATOM	1551	O	ALA A 213	43.600	51.185	83.403	1.00	24.96
ATOM	1552	CB	ALA A 213	45.039	54.071	84.259	1.00	21.55
ATOM	1553	N	PHE A 214	42.885	53.085	82.373	1.00	19.30
ATOM	1554	CA	PHE A 214	41.617	52.431	82.017	1.00	20.02
ATOM	1555	C	PHE A 214	41.798	51.170	81.197	1.00	20.38
ATOM	1556	O	PHE A 214	41.255	50.120	81.510	1.00	18.82
ATOM	1557	CB	PHE A 214	40.690	53.445	81.314	1.00	23.58
ATOM	1558	CG	PHE A 214	39.367	52.839	80.840	1.00	26.35
ATOM	1559	CD1	PHE A 214	38.249	52.765	81.711	1.00	24.66
ATOM	1560	CD2	PHE A 214	39.262	52.365	79.507	1.00	23.08
ATOM	1561	CE1	PHE A 214	37.032	52.191	81.265	1.00	27.05
ATOM	1562	CE2	PHE A 214	38.052	51.792	79.077	1.00	19.74
ATOM	1563	CZ	PHE A 214	36.951	51.697	79.944	1.00	22.04
ATOM	1564	N	GLN A 215	42.654	51.298	80.149	1.00	22.02
ATOM	1565	CA	GLN A 215	42.904	50.137	79.275	1.00	21.33
ATOM	1566	C	GLN A 215	43.354	48.889	79.995	1.00	21.73

THIS PAGE BLANK (USPTO)

41 / 47

F I G. 39

ATOM	1567	O	GLN A 215	42.823	47.783	79.875	1.00	21.17
ATOM	1568	CB	GLN A 215	43.970	50.520	78.278	1.00	22.37
ATOM	1569	CG	GLN A 215	43.483	51.517	77.261	1.00	22.30
ATOM	1570	CD	GLN A 215	44.662	52.026	76.479	1.00	28.18
ATOM	1571	OE1	GLN A 215	45.821	51.695	76.664	1.00	32.27
ATOM	1572	NE2	GLN A 215	44.359	52.947	75.605	1.00	28.35
ATOM	1573	N	GLN A 216	44.375	49.154	80.845	1.00	24.60
ATOM	1574	CA	GLN A 216	44.876	48.089	81.718	1.00	25.81
ATOM	1575	C	GLN A 216	43.909	47.530	82.715	1.00	23.07
ATOM	1576	O	GLN A 216	43.822	46.328	82.899	1.00	22.91
ATOM	1577	CB	GLN A 216	46.052	48.544	82.517	1.00	33.78
ATOM	1578	CG	GLN A 216	47.181	49.037	81.631	1.00	49.94
ATOM	1579	CD	GLN A 216	48.161	49.693	82.574	1.00	61.57
ATOM	1580	OE1	GLN A 216	48.354	49.243	83.704	1.00	69.34
ATOM	1581	NE2	GLN A 216	48.737	50.805	82.114	1.00	63.50
ATOM	1582	N	GLN A 217	43.155	48.439	83.377	1.00	22.58
ATOM	1583	CA	GLN A 217	42.099	47.917	84.261	1.00	23.69
ATOM	1584	C	GLN A 217	40.971	47.113	83.590	1.00	24.92
ATOM	1585	O	GLN A 217	40.480	46.102	84.088	1.00	24.09
ATOM	1586	CB	GLN A 217	41.565	49.042	85.189	1.00	23.44
ATOM	1587	CG	GLN A 217	40.720	48.541	86.407	1.00	23.24
ATOM	1588	CD	GLN A 217	41.489	47.589	87.335	1.00	21.58
ATOM	1589	OE1	GLN A 217	42.676	47.749	87.598	1.00	24.82
ATOM	1590	NE2	GLN A 217	40.827	46.516	87.744	1.00	19.85
ATOM	1591	N	LEU A 218	40.628	47.595	82.390	1.00	26.00
ATOM	1592	CA	LEU A 218	39.701	46.859	81.532	1.00	23.47
ATOM	1593	C	LEU A 218	40.195	45.495	81.093	1.00	21.96
ATOM	1594	O	LEU A 218	39.476	44.515	81.209	1.00	22.51
ATOM	1595	CB	LEU A 218	39.309	47.724	80.327	1.00	23.65
ATOM	1596	CG	LEU A 218	38.292	47.073	79.369	1.00	21.04
ATOM	1597	CD1	LEU A 218	38.103	47.980	78.168	1.00	25.30
ATOM	1598	CD2	LEU A 218	36.952	46.736	80.004	1.00	13.22
ATOM	1599	N	GLN A 219	41.451	45.425	80.640	1.00	23.49
ATOM	1600	CA	GLN A 219	42.033	44.079	80.457	1.00	29.37
ATOM	1601	C	GLN A 219	41.880	43.156	81.681	1.00	29.60
ATOM	1602	O	GLN A 219	41.455	42.016	81.569	1.00	29.63
ATOM	1603	CB	GLN A 219	43.544	44.131	80.199	1.00	37.46
ATOM	1604	CG	GLN A 219	44.052	44.703	78.867	1.00	51.74
ATOM	1605	CD	GLN A 219	45.511	45.267	78.911	1.00	60.29
ATOM	1606	OE1	GLN A 219	46.415	44.774	79.568	1.00	65.45
ATOM	1607	NE2	GLN A 219	45.764	46.352	78.161	1.00	60.81
ATOM	1608	N	LYS A 220	42.206	43.722	82.879	1.00	28.28
ATOM	1609	CA	LYS A 220	42.004	42.926	84.111	1.00	26.68
ATOM	1610	C	LYS A 220	40.588	42.446	84.386	1.00	24.54
ATOM	1611	O	LYS A 220	40.347	41.275	84.640	1.00	26.87
ATOM	1612	CB	LYS A 220	42.591	43.631	85.319	1.00	29.93
ATOM	1613	CG	LYS A 220	44.019	43.952	84.934	1.00	36.96
ATOM	1614	CD	LYS A 220	45.015	44.044	86.081	1.00	47.54
ATOM	1615	CE	LYS A 220	44.741	45.121	87.121	1.00	55.28
ATOM	1616	NZ	LYS A 220	44.868	46.456	86.510	1.00	61.92
ATOM	1617	N	ALA A 221	39.630	43.379	84.217	1.00	21.04
ATOM	1618	CA	ALA A 221	38.215	42.960	84.307	1.00	18.69
ATOM	1619	C	ALA A 221	37.761	41.903	83.291	1.00	24.31
ATOM	1620	O	ALA A 221	37.095	40.921	83.598	1.00	26.78

THIS PAGE BLANK (USPTO)

4 2 / 4 7

F I G. 4 0

ATOM	1621	CB	ALA	A	221	37.306	44.177	84.140	1.00	14.85
ATOM	1622	N	LYS	A	222	38.223	42.106	82.029	1.00	24.15
ATOM	1623	CA	LYS	A	222	38.065	41.018	81.046	1.00	23.96
ATOM	1624	C	LYS	A	222	38.668	39.675	81.431	1.00	22.61
ATOM	1625	O	LYS	A	222	38.023	38.628	81.422	1.00	21.88
ATOM	1626	CB	LYS	A	222	38.591	41.444	79.659	1.00	22.92
ATOM	1627	CG	LYS	A	222	37.682	42.516	79.109	1.00	22.76
ATOM	1628	CD	LYS	A	222	38.038	42.903	77.691	1.00	22.50
ATOM	1629	CE	LYS	A	222	37.050	43.918	77.109	1.00	22.07
ATOM	1630	NZ	LYS	A	222	37.556	44.613	75.909	1.00	21.47
ATOM	1631	N	ALA	A	223	39.949	39.728	81.830	1.00	22.84
ATOM	1632	CA	ALA	A	223	40.533	38.472	82.353	1.00	25.17
ATOM	1633	C	ALA	A	223	39.812	37.842	83.543	1.00	26.19
ATOM	1634	O	ALA	A	223	39.534	36.652	83.573	1.00	27.99
ATOM	1635	CB	ALA	A	223	42.013	38.638	82.691	1.00	21.36
ATOM	1636	N	GLU	A	224	39.424	38.696	84.487	1.00	27.72
ATOM	1637	CA	GLU	A	224	38.643	38.187	85.610	1.00	27.59
ATOM	1638	C	GLU	A	224	37.338	37.525	85.191	1.00	28.89
ATOM	1639	O	GLU	A	224	36.971	36.412	85.568	1.00	28.75
ATOM	1640	CB	GLU	A	224	38.476	39.348	86.606	1.00	29.18
ATOM	1641	CG	GLU	A	224	37.470	39.099	87.741	1.00	29.05
ATOM	1642	CD	GLU	A	224	37.335	40.348	88.557	1.00	29.41
ATOM	1643	OE1	GLU	A	224	36.506	41.189	88.269	1.00	28.08
ATOM	1644	OE2	GLU	A	224	38.060	40.487	89.516	1.00	31.14
ATOM	1645	N	PHE	A	225	36.659	38.233	84.288	1.00	29.33
ATOM	1646	CA	PHE	A	225	35.398	37.699	83.770	1.00	28.70
ATOM	1647	C	PHE	A	225	35.551	36.354	83.061	1.00	31.53
ATOM	1648	O	PHE	A	225	34.802	35.399	83.222	1.00	29.17
ATOM	1649	CB	PHE	A	225	34.786	38.756	82.858	1.00	26.48
ATOM	1650	CG	PHE	A	225	33.449	38.281	82.361	1.00	25.90
ATOM	1651	CD1	PHE	A	225	32.361	38.258	83.250	1.00	28.71
ATOM	1652	CD2	PHE	A	225	33.317	37.854	81.022	1.00	28.64
ATOM	1653	CE1	PHE	A	225	31.129	37.758	82.817	1.00	29.98
ATOM	1654	CE2	PHE	A	225	32.074	37.365	80.564	1.00	28.53
ATOM	1655	CZ	PHE	A	225	30.998	37.309	81.479	1.00	30.02
ATOM	1656	N	ALA	A	226	36.635	36.308	82.289	1.00	31.91
ATOM	1657	CA	ALA	A	226	36.996	35.055	81.643	1.00	36.17
ATOM	1658	C	ALA	A	226	37.178	33.829	82.536	1.00	40.94
ATOM	1659	O	ALA	A	226	36.704	32.735	82.271	1.00	41.75
ATOM	1660	CB	ALA	A	226	38.284	35.261	80.877	1.00	33.81
ATOM	1661	N	GLN	A	227	37.883	34.081	83.647	1.00	44.91
ATOM	1662	CA	GLN	A	227	38.067	32.931	84.543	1.00	49.32
ATOM	1663	C	GLN	A	227	36.782	32.579	85.233	1.00	51.62
ATOM	1664	O	GLN	A	227	36.396	31.467	85.528	1.00	50.02
ATOM	1665	CB	GLN	A	227	39.239	33.150	85.499	1.00	50.80
ATOM	1666	CG	GLN	A	227	40.441	33.937	84.900	1.00	59.92
ATOM	1667	CD	GLN	A	227	40.812	33.681	83.397	1.00	68.68
ATOM	1668	OE1	GLN	A	227	40.799	32.592	82.834	1.00	73.97
ATOM	1669	NE2	GLN	A	227	41.221	34.764	82.726	1.00	65.71
ATOM	1670	N	HIS	A	228	36.041	33.669	85.411	1.00	58.91
ATOM	1671	CA	HIS	A	228	34.687	33.501	85.925	1.00	65.53
ATOM	1672	C	HIS	A	228	33.816	32.519	85.143	1.00	68.04
ATOM	1673	O	HIS	A	228	33.014	31.764	85.662	1.00	67.46
ATOM	1674	CB	HIS	A	228	34.091	34.903	86.045	1.00	68.11

THIS PAGE BLANK (USPTO)

FIG. 41

43/47

ATOM	1675	CG	HIS	A	228	32.632	34.780	86.283	1.00	71.87
ATOM	1676	ND1	HIS	A	228	31.729	34.968	85.313	1.00	74.51
ATOM	1677	CD2	HIS	A	228	32.007	34.363	87.458	1.00	75.53
ATOM	1678	CE1	HIS	A	228	30.511	34.660	85.852	1.00	78.68
ATOM	1679	NE2	HIS	A	228	30.682	34.288	87.171	1.00	80.02
ATOM	1680	N	GLN	A	229	34.061	32.545	83.846	1.00	74.45
ATOM	1681	CA	GLN	A	229	33.306	31.659	82.963	1.00	81.06
ATOM	1682	C	GLN	A	229	33.569	30.149	83.028	1.00	85.59
ATOM	1683	O	GLN	A	229	33.123	29.427	82.135	1.00	86.52
ATOM	1684	CB	GLN	A	229	33.477	32.181	81.530	1.00	81.47
ATOM	1685	CG	GLN	A	229	33.002	33.631	81.335	1.00	81.55
ATOM	1686	CD	GLN	A	229	31.488	33.690	81.352	1.00	83.81
ATOM	1687	OE1	GLN	A	229	30.804	33.832	82.355	1.00	82.35
ATOM	1688	NE2	GLN	A	229	30.950	33.588	80.141	1.00	86.80
ATOM	1689	N	LYS	A	230	34.317	29.749	84.086	1.00	91.08
ATOM	1690	CA	LYS	A	230	34.965	28.444	84.325	1.00	95.45
ATOM	1691	CB	LYS	A	230	33.976	27.245	84.052	1.00	97.51
ATOM	1692	CG	LYS	A	230	34.256	26.053	83.073	1.00	98.30
ATOM	1693	CD	LYS	A	230	34.035	26.121	81.534	1.00	98.30
ATOM	1694	CE	LYS	A	230	34.810	27.172	80.713	1.00	100.00
ATOM	1695	NZ	LYS	A	230	36.244	27.239	81.067	1.00	100.00
ATOM	1696	C	LYS	A	230	36.409	28.279	83.743	1.00	97.06
ATOM	1697	OCT1	LYS	A	230	36.876	29.108	82.942	1.00	95.86
ATOM	1698	OCT2	LYS	A	230	37.052	27.241	83.957	1.00	99.89
ATOM	1935	S	SO4	S	231	22.561	63.872	89.148	1.00	45.29
ATOM	1936	O1	SO4	S	231	21.748	62.858	88.279	1.00	50.45
ATOM	1937	O2	SO4	S	231	21.648	64.707	90.036	1.00	51.74
ATOM	1938	O3	SO4	S	231	23.551	63.095	90.035	1.00	49.75
ATOM	1939	O4	SO4	S	231	23.260	64.912	88.285	1.00	44.08
ATOM	1	O	HOH	W	232	10.522	63.513	85.670	1.00	17.86
ATOM	2	O	HOH	W	233	34.116	63.633	80.578	1.00	20.45
ATOM	3	O	HOH	W	234	7.928	61.775	88.229	1.00	15.62
ATOM	4	O	HOH	W	235	10.374	64.545	82.597	1.00	14.58
ATOM	5	O	HOH	W	236	15.375	75.641	85.508	1.00	22.07
ATOM	6	O	HOH	W	237	20.773	44.507	86.785	1.00	18.67
ATOM	7	O	HOH	W	238	32.701	49.912	75.935	1.00	15.79
ATOM	8	O	HOH	W	239	21.979	72.096	84.493	1.00	19.08
ATOM	9	O	HOH	W	240	13.158	73.905	82.705	1.00	27.34
ATOM	10	O	HOH	W	241	14.358	71.880	73.410	1.00	26.83
ATOM	11	O	HOH	W	242	5.537	80.043	74.802	1.00	23.33
ATOM	12	O	HOH	W	243	36.136	62.604	78.407	1.00	23.19
ATOM	13	O	HOH	W	244	30.393	53.028	87.579	1.00	19.02
ATOM	14	O	HOH	W	245	28.532	49.107	93.252	1.00	21.32
ATOM	15	O	HOH	W	246	24.657	73.146	75.882	1.00	20.92
ATOM	16	O	HOH	W	247	10.080	55.567	81.848	1.00	33.80
ATOM	17	O	HOH	W	248	29.907	52.840	73.379	1.00	22.59
ATOM	18	O	HOH	W	249	38.583	48.054	74.575	1.00	24.10
ATOM	19	O	HOH	W	250	29.465	68.020	86.676	1.00	32.30
ATOM	20	O	HOH	W	251	12.847	73.680	85.460	1.00	40.76
ATOM	21	O	HOH	W	252	5.516	59.770	95.129	1.00	40.84
ATOM	22	O	HOH	W	253	42.504	47.354	77.319	1.00	30.77
ATOM	23	O	HOH	W	254	13.495	75.378	74.412	1.00	22.57
ATOM	24	O	HOH	W	255	17.100	76.564	77.737	1.00	30.00
ATOM	25	O	HOH	W	256	33.508	40.103	102.712	1.00	26.49

THIS PAGE BLANK (USPTO)

4 4 / 4 7

F I G. 4 2

ATOM	26	O	HOH W 257	20.825	55.648	81.278	1.00	20.11
ATOM	27	O	HOH W 258	19.730	61.701	89.970	1.00	23.10
ATOM	28	O	HOH W 259	4.363	74.520	80.720	1.00	33.74
ATOM	29	O	HOH W 260	31.490	42.656	98.480	1.00	34.19
ATOM	30	O	HOH W 261	6.696	75.130	78.477	1.00	15.66
ATOM	31	O	HOH W 262	10.667	67.023	75.103	1.00	38.86
ATOM	32	O	HOH W 263	8.252	64.433	92.307	1.00	23.15
ATOM	33	O	HOH W 264	41.924	51.223	74.247	1.00	30.19
ATOM	34	O	HOH W 265	1.437	67.705	89.398	1.00	39.48
ATOM	35	O	HOH W 266	4.055	66.946	91.467	1.00	29.22
ATOM	36	O	HOH W 267	3.092	69.112	84.950	1.00	25.58
ATOM	37	O	HOH W 268	9.537	59.065	79.795	1.00	30.90
ATOM	38	O	HOH W 269	9.306	83.197	79.638	1.00	44.19
ATOM	39	O	HOH W 270	34.786	41.166	75.522	1.00	32.98
ATOM	40	O	HOH W 271	28.084	37.193	84.163	1.00	30.43
ATOM	41	O	HOH W 272	40.742	49.227	76.024	1.00	21.82
ATOM	42	O	HOH W 273	35.074	40.712	85.668	1.00	29.87
ATOM	43	O	HOH W 274	30.318	45.526	96.384	1.00	35.57
ATOM	44	O	HOH W 275	31.493	69.162	80.850	1.00	19.51
ATOM	45	O	HOH W 276	42.914	61.700	76.016	1.00	28.69
ATOM	46	O	HOH W 277	34.422	64.714	92.625	1.00	38.81
ATOM	47	O	HOH W 278	13.405	78.374	80.916	1.00	25.22
ATOM	48	O	HOH W 279	44.634	57.811	84.433	1.00	31.73
ATOM	49	O	HOH W 280	44.303	60.992	82.740	1.00	28.14
ATOM	50	O	HOH W 281	32.596	51.432	73.247	1.00	22.63
ATOM	51	O	HOH W 282	22.182	40.126	75.125	1.00	27.50
ATOM	52	O	HOH W 283	18.482	55.362	89.100	1.00	21.25
ATOM	53	O	HOH W 284	36.960	42.360	74.192	1.00	28.88
ATOM	54	O	HOH W 285	35.881	48.845	94.047	1.00	26.90
ATOM	55	O	HOH W 286	26.212	59.698	94.760	1.00	23.37
ATOM	56	O	HOH W 287	29.246	44.303	73.369	1.00	40.38
ATOM	57	O	HOH W 288	27.356	35.947	80.422	1.00	31.74
ATOM	58	O	HOH W 289	40.482	45.029	76.766	1.00	30.88
ATOM	59	O	HOH W 290	24.864	58.724	91.112	1.00	25.30
ATOM	60	O	HOH W 291	28.560	61.547	91.755	1.00	39.37
ATOM	61	O	HOH W 292	27.888	63.113	90.252	1.00	40.28
ATOM	62	O	HOH W 293	31.069	41.023	103.435	1.00	38.13
ATOM	63	O	HOH W 294	5.144	47.860	86.978	1.00	37.63
ATOM	64	O	HOH W 295	29.373	52.425	90.409	1.00	21.69
ATOM	65	O	HOH W 296	41.571	51.401	87.864	1.00	31.72
ATOM	66	O	HOH W 297	35.633	56.807	101.396	1.00	42.27
ATOM	67	O	HOH W 298	35.257	40.157	78.063	1.00	30.17
ATOM	68	O	HOH W 299	33.734	71.189	79.910	1.00	32.64
ATOM	69	O	HOH W 300	17.659	69.593	75.158	1.00	46.73
ATOM	70	O	HOH W 301	17.005	72.932	72.774	1.00	33.93
ATOM	71	O	HOH W 302	15.769	48.059	85.107	1.00	24.21
ATOM	72	O	HOH W 303	15.023	64.697	75.333	1.00	39.99
ATOM	73	O	HOH W 304	13.546	67.305	74.469	1.00	38.11
ATOM	74	O	HOH W 305	30.044	75.863	82.738	1.00	29.02
ATOM	75	O	HOH W 306	5.253	66.383	98.323	1.00	61.09
ATOM	76	O	HOH W 307	25.914	72.829	89.073	1.00	48.08
ATOM	77	O	HOH W 308	38.474	67.620	76.050	1.00	32.88
ATOM	78	O	HOH W 309	34.101	41.534	100.215	1.00	39.54
ATOM	79	O	HOH W 310	29.974	37.419	76.650	1.00	39.99

THIS PAGE BLANK (USPTO)

4 5 / 4 7

F I G. 4 3

ATOM	80	O	HOH W 311	17.829	44.406	81.773	1.00	29.29
ATOM	81	O	HOH W 312	17.766	66.478	75.705	1.00	34.51
ATOM	82	O	HOH W 313	35.983	70.225	78.152	1.00	38.85
ATOM	83	O	HOH W 314	18.063	58.644	75.592	1.00	33.24
ATOM	84	O	HOH W 315	17.740	45.824	75.692	1.00	31.29
ATOM	85	O	HOH W 316	21.442	55.668	101.498	1.00	30.06
ATOM	86	O	HOH W 317	30.660	37.639	105.501	1.00	46.34
ATOM	87	O	HOH W 318	28.143	47.582	99.410	1.00	71.00
ATOM	88	O	HOH W 319	11.398	65.394	76.821	1.00	34.86
ATOM	89	O	HOH W 320	31.737	45.760	98.744	1.00	38.11
ATOM	90	O	HOH W 321	16.084	45.559	87.137	1.00	43.68
ATOM	91	O	HOH W 322	36.498	37.962	78.989	1.00	35.45
ATOM	92	O	HOH W 323	41.868	42.172	76.980	1.00	56.04
ATOM	93	O	HOH W 324	44.704	68.004	76.606	1.00	73.28
ATOM	94	O	HOH W 325	30.214	44.935	101.119	1.00	28.63
ATOM	95	O	HOH W 326	43.719	69.244	83.004	1.00	32.20
ATOM	96	O	HOH W 327	7.992	54.768	93.490	1.00	36.05
ATOM	97	O	HOH W 328	11.059	49.604	75.476	1.00	43.80
ATOM	98	O	HOH W 329	17.730	37.202	79.516	1.00	44.41
ATOM	99	O	HOH W 330	14.170	59.796	74.913	1.00	70.26
ATOM	100	O	HOH W 331	28.648	70.326	88.645	1.00	34.35
ATOM	101	O	HOH W 332	16.146	57.197	73.492	1.00	49.27
ATOM	102	O	HOH W 333	11.086	52.502	82.116	1.00	39.47
ATOM	103	O	HOH W 334	15.950	60.744	73.392	1.00	63.16
ATOM	104	O	HOH W 335	23.809	74.443	89.142	1.00	63.73
ATOM	105	O	HOH W 336	43.077	70.945	86.543	1.00	41.77
ATOM	106	O	HOH W 337	44.625	68.578	85.466	1.00	42.53
ATOM	107	O	HOH W 338	38.003	70.941	79.707	1.00	47.97
ATOM	108	O	HOH W 339	42.635	39.826	86.317	1.00	39.90
ATOM	109	O	HOH W 340	28.158	51.028	97.893	1.00	35.28
ATOM	110	O	HOH W 341	34.562	57.666	98.193	1.00	56.42
ATOM	111	O	HOH W 342	23.659	34.535	79.197	1.00	84.39
ATOM	112	O	HOH W 343	10.337	58.458	76.704	1.00	45.85
ATOM	113	O	HOH W 344	32.164	75.101	85.461	1.00	54.21
ATOM	114	O	HOH W 345	32.930	38.410	86.586	1.00	43.15
ATOM	115	O	HOH W 346	32.310	36.987	102.558	1.00	47.71
ATOM	116	O	HOH W 347	11.163	49.101	82.634	1.00	84.37
ATOM	117	O	HOH W 348	34.268	69.634	83.019	1.00	47.39
ATOM	118	O	HOH W 349	31.352	37.085	89.579	1.00	74.88
ATOM	119	O	HOH W 350	29.118	56.986	95.860	1.00	34.59
ATOM	120	O	HOH W 351	1.634	70.786	81.659	1.00	41.89
ATOM	121	O	HOH W 352	2.044	71.714	85.736	1.00	37.84
ATOM	122	O	HOH W 353	16.219	75.511	74.471	1.00	44.53
ATOM	123	O	HOH W 354	24.035	45.705	97.204	1.00	48.11
ATOM	124	O	HOH W 355	17.939	77.382	82.853	1.00	65.65
ATOM	125	O	HOH W 356	12.504	76.991	70.634	1.00	50.43
ATOM	126	O	HOH W 357	16.951	78.295	74.889	1.00	47.02
ATOM	127	O	HOH W 358	15.777	75.404	81.566	1.00	33.68
ATOM	128	O	HOH W 359	37.401	72.376	82.831	1.00	50.52
ATOM	129	O	HOH W 360	14.060	44.359	88.918	1.00	80.84
ATOM	130	O	HOH W 361	32.619	76.123	75.757	1.00	42.84
ATOM	131	O	HOH W 362	21.836	66.226	94.339	1.00	63.40
ATOM	132	O	HOH W 363	16.011	46.526	82.837	1.00	38.42
ATOM	133	O	HOH W 364	7.716	57.886	82.470	1.00	50.22

THIS PAGE BLANK (USPTO)

4 6 / 4 7

F I G. 4 4

ATOM	134	O	HOH W 365	41.813	72.155	81.960	1.00	76.60
ATOM	135	O	HOH W 366	5.810	63.614	94.440	1.00	41.72
ATOM	136	O	HOH W 367	22.833	66.006	98.308	1.00	65.79
ATOM	137	O	HOH W 368	21.384	36.791	76.692	1.00	59.29
ATOM	138	O	HOH W 369	38.765	52.950	92.219	1.00	27.87
ATOM	139	O	HOH W 370	46.430	68.991	81.609	1.00	70.52
ATOM	140	O	HOH W 371	36.973	69.709	83.153	1.00	33.81
ATOM	141	O	HOH W 372	22.238	43.716	92.825	1.00	44.49
ATOM	142	O	HOH W 373	23.096	80.189	77.308	1.00	50.73
ATOM	143	O	HOH W 374	2.790	53.932	81.478	1.00	50.22
ATOM	144	O	HOH W 375	3.292	64.768	94.055	1.00	46.64
ATOM	145	O	HOH W 376	26.937	79.257	75.755	1.00	47.21
ATOM	146	O	HOH W 377	45.046	50.594	85.873	1.00	46.10
ATOM	147	O	HOH W 378	24.988	68.312	90.158	1.00	39.03
ATOM	148	O	HOH W 379	2.045	61.203	93.643	1.00	49.73
ATOM	149	O	HOH W 380	44.273	56.110	87.700	1.00	46.74
ATOM	150	O	HOH W 381	26.747	76.462	73.043	1.00	50.91
ATOM	151	O	HOH W 382	40.545	70.889	76.918	1.00	68.80
ATOM	152	O	HOH W 383	25.523	80.486	83.807	1.00	67.90
ATOM	153	O	HOH W 384	40.972	36.296	87.372	1.00	66.49
ATOM	154	O	HOH W 385	12.617	56.710	77.567	1.00	44.81
ATOM	155	O	HOH W 386	44.460	48.054	74.082	1.00	41.02
ATOM	156	O	HOH W 387	35.781	73.896	86.117	1.00	38.14
ATOM	157	O	HOH W 388	21.625	80.398	81.815	1.00	47.96
ATOM	158	O	HOH W 389	46.628	56.635	82.977	1.00	50.89
ATOM	159	O	HOH W 390	12.308	51.573	78.083	1.00	64.92
ATOM	160	O	HOH W 391	30.773	39.420	87.798	1.00	55.92
ATOM	161	O	HOH W 392	26.088	65.110	89.923	1.00	44.80
ATOM	162	O	HOH W 393	10.719	70.886	96.928	1.00	48.46
ATOM	163	O	HOH W 394	12.474	47.243	84.457	1.00	53.08
ATOM	164	O	HOH W 395	24.296	71.312	91.828	1.00	48.39
ATOM	165	O	HOH W 396	6.459	50.108	83.133	1.00	57.82
ATOM	166	O	HOH W 397	42.423	66.213	75.196	1.00	34.97
ATOM	167	O	HOH W 398	29.045	53.518	101.769	1.00	46.59
ATOM	168	O	HOH W 399	27.195	39.655	105.406	1.00	41.59
ATOM	169	O	HOH W 400	6.834	56.385	96.211	1.00	45.81
ATOM	170	O	HOH W 401	47.957	50.138	78.280	1.00	43.60
ATOM	171	O	HOH W 402	23.330	36.461	72.787	1.00	54.41
ATOM	172	O	HOH W 403	29.051	79.533	81.900	1.00	78.87
ATOM	173	O	HOH W 404	46.670	55.026	74.340	1.00	68.61
ATOM	174	O	HOH W 405	28.985	78.746	85.840	1.00	75.16
ATOM	175	O	HOH W 406	32.117	68.589	73.365	1.00	42.10
ATOM	176	O	HOH W 407	48.677	52.842	75.727	1.00	66.77
ATOM	177	O	HOH W 408	29.185	36.245	72.017	1.00	75.24
ATOM	178	O	HOH W 409	37.168	67.596	97.670	1.00	38.24
ATOM	179	O	HOH W 410	11.986	77.352	92.370	1.00	35.94
ATOM	180	O	HOH W 411	39.548	63.174	98.280	1.00	39.58
ATOM	181	O	HOH W 412	30.500	79.967	79.292	1.00	62.87
ATOM	182	O	HOH W 413	18.003	41.205	83.764	1.00	64.48
ATOM	183	O	HOH W 414	34.455	37.242	89.080	1.00	52.58
ATOM	184	O	HOH W 415	47.074	60.938	83.746	1.00	66.98
ATOM	185	O	HOH W 416	10.880	54.535	78.559	1.00	45.29
ATOM	186	O	HOH W 417	30.230	76.830	74.341	1.00	71.09
ATOM	187	O	HOH W 418	12.118	81.147	79.341	1.00	49.66

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

配列表
SEQUENCE LISTING

<110> Ajinomoto Co., Inc. (味の素株式会社)

<120> 変異型ヌクレオシド-5'-リン酸生産酵素

<130> B637SMOP1051

<141> 2000-09-01

<150> JP 11-249545

<151> 1999-09-03

<160> 123

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1225

<212> DNA

<213> Escherichia blattae

<220>

<221> CDS

<222> (331)..(1077)

<400> 1

```
ctgcaggcga aaggcaatgt ggtggccggt gagacggcac tctacgagat taaggataag 60
taactatcca ttattacagg taacagcatt gctcctgagt gtgatgtcat acctgagcgg 120
cgcggggggtt ccccgggcgg ctttttttta tggggctgcg gtgaggagcg ttatctgctg 180
gccctgtttg tgcaacaaac gcttttattg tgtaattttt gtgacgtata tcaggttttt 240
aagcaccctg tggcgctcat actggcaacc tgttgatatt aagcaacact cttcactcac 300
ggaattaaca cgcacagtaa aggtatacgc atg aaa aaa cgt gtt ctg gca gtt 354
Met Lys Lys Arg Val Leu Ala Val
```

1.

5

```
tgt ttt gcc gca ttg ttc tct tct cag gcc ctg gcg ctg gtc gct acc 402
Cys Phe Ala Ala Leu Phe Ser Ser Gln Ala Leu Ala Leu Val Ala Thr
10 15 20
ggc aac gac act acc acg aaa ccg gat ctc tac tac ctc aag aac agt 450
Gly Asn Asp Thr Thr Thr Lys Pro Asp Leu Tyr Tyr Leu Lys Asn Ser
25 30 35 40
gaa gcc att aac agc ctg gcg ctg ttg ccg cca cca ccg gcg gtg ggc 498
```

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2/44

Glu Ala Ile Asn Ser Leu Ala Leu Leu Pro Pro Pro Pro Ala Val Gly	
45 50 55	
tcc att gcg ttt ctc aac gat cag gcc atg tat gaa cag ggg cgc ctg	546
Ser Ile Ala Phe Leu Asn Asp Gln Ala Met Tyr Glu Gln Gly Arg Leu	
60 65 70	
ctg cgc aac acc gaa cgc ggt aag ctg gcg gcg gaa gat gca aac ctg	594
Leu Arg Asn Thr Glu Arg Gly Lys Leu Ala Ala Glu Asp Ala Asn Leu	
75 80 85	
agc agt ggc ggg gtg gcg aat gct ttc tcc ggc gcg ttt ggt agc ccg	642
Ser Ser Gly Gly Val Ala Asn Ala Phe Ser Gly Ala Phe Gly Ser Pro	
90 95 100	
atc acc gaa aaa gac gcc ccg gcg ctg cat aaa tta ctg acc aat atg	690
Ile Thr Glu Lys Asp Ala Pro Ala Leu His Lys Leu Leu Thr Asn Met	
105 110 115 120	
att gag gac gcc ggg gat ctg gcg acc cgc agc gcg aaa gat cac tat	738
Ile Glu Asp Ala Gly Asp Leu Ala Thr Arg Ser Ala Lys Asp His Tyr	
125 130 135	
atg cgc att cgt ccg ttc gcg ttt tat ggg gtc tct acc tgt aat acc	786
Met Arg Ile Arg Pro Phe Ala Phe Tyr Gly Val Ser Thr Cys Asn Thr	
140 145 150	
acc gag cag gac aaa ctg tcc aaa aat ggc tct tat ccg tcc ggg cat	834
Thr Glu Gln Asp Lys Leu Ser Lys Asn Gly Ser Tyr Pro Ser Gly His	
155 160 165	
acc tct atc ggc tgg gct act gcg ctg gtg ctg gca gag atc aac cct	882
Thr Ser Ile Gly Trp Ala Thr Ala Leu Val Leu Ala Glu Ile Asn Pro	
170 175 180	
cag cgc cag aac gag atc ctg aaa cgc ggt tat gag ctg ggc cag agc	930
Gln Arg Gln Asn Glu Ile Leu Lys Arg Gly Tyr Glu Leu Gly Gln Ser	
185 190 195 200	
cgg gtg att tgc ggc tac cac tgg cag agt gat gtg gat gcc gcg cgg	978
Arg Val Ile Cys Gly Tyr His Trp Gln Ser Asp Val Asp Ala Ala Arg	
205 210 215	
gta gtg gga tct gcc gtt gtg gcg acc ctg cat acc aac ccg gcg ttc	1026
Val Val Gly Ser Ala Val Val Ala Thr Leu His Thr Asn Pro Ala Phe	
220 225 230	
cag cag cag ttg cag aaa gcg aag gcc gaa ttc gcc cag cat cag aag	1074
Gln Gln Gln Leu Gln Lys Ala Lys Ala Glu Phe Ala Gln His Gln Lys	
235 240 245	
aaa taatcctgac taccgccttg ccttgcaggg cggtagtggt ttccactggc	1127
Lys	
cccgatcgc tattccca gtaataatga cggtatatga ttttgtgcaa cgaaaagggtt	1187
gtgtcagccc acagcttata agatcatgtg ccgttaac	1225

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<400> 2

<210> 3

<211> 1344

<212> DNA

<213> *Morganella morganii*

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<220>

<221> CDS

<222> (316)..(1062)

<400> 3

```

gaattccgga aaatttcatt cattttaatt gttaagaata tgctggcaaa aacaaaaccc 60
aatgctttat attttcttat aatatctgtg tggtatcttt ttcaatacta tcggtcaggt 120
cttatttata cgttcgttaa caaaagccat gctgtttctg tcaaattata tgaaaatcat 180
catcaaaaat acttacctgt ctccgtctg tttcgtcaca cttttttgaa agagttaaca 240
tcaatttgca tctctccgcc ctacctggc agacagggtt ctgagtaata ctgttgatc 300
tgataaggag atgtc atg aag aag aat att atc gcc ggt tgt ctg ttc tca 351
          Met Lys Lys Asn Ile Ile Ala Gly Cys Leu Phe Ser
                1                5                10
ctg ttt tcc ett tcc gcg ctg gcc gcg atc ccg gcg ggc aac gat gcc 399
Leu Phe Ser Leu Ser Ala Leu Ala Ala Ile Pro Ala Gly Asn Asp Ala
                15                20                25
acc acc aag ccg gat tta tat tat ctg aaa aat gaa cag gct atc gac 447
Thr Thr Lys Pro Asp Leu Tyr Tyr Leu Lys Asn Glu Gln Ala Ile Asp
                30                35                40
agc ctg aaa ctg tta ccg cca ccg ccg gaa gtc ggc agt att cag ttt 495
Ser Leu Lys Leu Leu Pro Pro Pro Pro Glu Val Gly Ser Ile Gln Phe
                45                50                55                60
tta aat gat cag gca atg tat gag aaa ggc cgt atg ctg cgc aat acc 543
Leu Asn Asp Gln Ala Met Tyr Glu Lys Gly Arg Met Leu Arg Asn Thr
                65                70                75
gag cgc gga aaa cag gca cag gca gat gct gac ctg gcc gca ggg ggt 591
Glu Arg Gly Lys Gln Ala Gln Ala Asp Ala Asp Leu Ala Ala Gly Gly
                80                85                90
gtg gca acc gca ttt tca ggg gca ttc ggc tat ccg ata acc gaa aaa 639
Val Ala Thr Ala Phe Ser Gly Ala Phe Gly Tyr Pro Ile Thr Glu Lys
                95                100                105
gac tct ccg gag ctg tat aaa ctg ctg acc aat atg att gag gat gcc 687
Asp Ser Pro Glu Leu Tyr Lys Leu Leu Thr Asn Met Ile Glu Asp Ala
                110                115                120
ggt gat ctt gcc acc cgc tcc gcc aaa gaa cat tac atg cgc atc cgg 735
Gly Asp Leu Ala Thr Arg Ser Ala Lys Glu His Tyr Met Arg Ile Arg
                125                130                135                140
ccg ttt gcg ttt tac ggc aca gaa acc tgt aat acc aaa gat cag aaa 783
Pro Phe Ala Phe Tyr Gly Thr Glu Thr Cys Asn Thr Lys Asp Gln Lys
                145                150                155
aaa ctc tcc acc aac gga tct tac ccg tca ggt cat acg tct atc ggc 831
Lys Leu Ser Thr Asn Gly Ser Tyr Pro Ser Gly His Thr Ser Ile Gly

```

THIS PAGE BLANK (uspto)

5/44

160	165	170	
tgg gca acc gca ctg gtg ctg gcg gaa gtg aac ccg gca aat cag gat	879		
Trp Ala Thr Ala Leu Val Leu Ala Glu Val Asn Pro Ala Asn Gln Asp			
175	180	185	
gcg att ctg gaa cgg ggt tat cag ctc gga cag agc cgg gtg att tgc	927		
Ala Ile Leu Glu Arg Gly Tyr Gln Leu Gly Gln Ser Arg Val Ile Cys			
190	195	200	
ggc tat cac tgg cag agt gat gtg gat gcc gcg cgg att gtc ggt tca	975		
Gly Tyr His Trp Gln Ser Asp Val Asp Ala Ala Arg Ile Val Gly Ser			
205	210	215	220
gcc gct gtc gcg aca tta cat tcc gat ccg gca ttt cag gcg cag tta	1023		
Ala Ala Val Ala Thr Leu His Ser Asp Pro Ala Phe Gln Ala Gln Leu			
225	230	235	
gcg aaa gcc aaa cag gaa ttt gca caa aaa tca cag aaa taaaagcagt	1072		
Ala Lys Ala Lys Gln Glu Phe Ala Gln Lys Ser Gln Lys			
240	245		
gatatctggt cagggcagtg caatatctgc cctgaaatcc ctgtttattc ccacatccag	1132		
cgttcttccc gatccagccc ttttgttttc atgcagctgt agaaatagcg gttgcggctg	1192		
tcttcattca catccatcac ataactttcc gttaccggtg tctgctcttt gtaggttttg	1252		
ctgttaccgc agtcacgtc ttttttgcag cgtttctcca catcccgcat cacactgcgc	1312		
tgagcaactt catttttcac cggataaagc tt	1344		

<210> 4

<211> 249

<212> PRT

<213> *Morganella morganii*

<400> 4

Met Lys Lys Asn Ile Ile Ala Gly Cys Leu Phe Ser Leu Phe Ser Leu	
1 5 10 15	
Ser Ala Leu Ala Ala Ile Pro Ala Gly Asn Asp Ala Thr Thr Lys Pro	
20 25 30	
Asp Leu Tyr Tyr Leu Lys Asn Glu Gln Ala Ile Asp Ser Leu Lys Leu	
35 40 45	
Leu Pro Pro Pro Pro Glu Val Gly Ser Ile Gln Phe Leu Asn Asp Gln	
50 55 60	
Ala Met Tyr Glu Lys Gly Arg Met Leu Arg Asn Thr Glu Arg Gly Lys	
65 70 75 80	
Gln Ala Gln Ala Asp Ala Asp Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Thr Ala	
85 90 95	
Phe Ser Gly Ala Phe Gly Tyr Pro Ile Thr Glu Lys Asp Ser Pro Glu	
100 105 110	
Leu Tyr Lys Leu Leu Thr Asn Met Ile Glu Asp Ala Gly Asp Leu Ala	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

6/44

115	120	125
Thr Arg Ser Ala Lys Glu His Tyr Met Arg Ile Arg Pro Phe Ala Phe		
130	135	140
Tyr Gly Thr Glu Thr Cys Asn Thr Lys Asp Gln Lys Lys Leu Ser Thr		
145	150	155
Asn Gly Ser Tyr Pro Ser Gly His Thr Ser Ile Gly Trp Ala Thr Ala		
165	170	175
Leu Val Leu Ala Glu Val Asn Pro Ala Asn Gln Asp Ala Ile Leu Glu		
180	185	190
Arg Gly Tyr Gln Leu Gly Gln Ser Arg Val Ile Cys Gly Tyr His Trp		
195	200	205
Gln Ser Asp Val Asp Ala Ala Arg Ile Val Gly Ser Ala Ala Val Ala		
210	215	220
Thr Leu His Ser Asp Pro Ala Phe Gln Ala Gln Leu Ala Lys Ala Lys		
225	230	235
Gln Glu Phe Ala Gln Lys Ser Gln Lys		240
245		

<210> 5

<211> 991

<212> DNA

<213> Salmonella typhimurium

<220>

<221> CDS

<222> (132)..(827)

<400> 5

```

cagtcggtgta tggacagacg ataatgccag ggcgcagcgtc ctgctttttt acctgtatgt 60
tgaataacca ttgcaataaa tcattatagg attacatctg tttattattg cctgatccgg 120
agtgagtctt t atg aaa agt cgt tat tta gta ttt ttt cta cca ctg atc 170
      Met Lys Ser Arg Tyr Leu Val Phe Phe Leu Pro Leu Ile
          1              5              10
gta gct aaa tat aca tca gca gaa aca gtg caa ccc ttt cat tct cct 218
Val Ala Lys Tyr Thr Ser Ala Glu Thr Val Gln Pro Phe His Ser Pro
      15              20              25
gaa gaa tca gtg aac agt cag ttc tac tta cca cca ccg cca ggt aat 266
Glu Glu Ser Val Asn Ser Gln Phe Tyr Leu Pro Pro Pro Pro Gly Asn
      30              35              40              45
gat gat ccg gct tac cgc tat gat aag gag gct tat ttt aag ggc tat 314
Asp Asp Pro Ala Tyr Arg Tyr Asp Lys Glu Ala Tyr Phe Lys Gly Tyr
          50              55              60
gcg ata aag ggt tcc ccg cga tgg aaa caa gct gct gag gat gca gat 362

```

THIS PAGE BLANK (USPTO)

7/44

```

Ala Ile Lys Gly Ser Pro Arg Trp Lys Gln Ala Ala Glu Asp Ala Asp
      65              70              75
gta agc gtg gaa aat ata gcc aga ata ttc tcg cca gta gtg ggt gct 410
Val Ser Val Glu Asn Ile Ala Arg Ile Phe Ser Pro Val Val Gly Ala
      80              85              90
aaa att aac ccc aaa gat acg cca gaa acc tgg aat atg tta aag aat 458
Lys Ile Asn Pro Lys Asp Thr Pro Glu Thr Trp Asn Met Leu Lys Asn
      95              100             105
ctt ctg aca atg ggc ggc tac tac gct act gct tcg gca aaa aaa tat 506
Leu Leu Thr Met Gly Gly Tyr Tyr Ala Thr Ala Ser Ala Lys Lys Tyr
110              115              120              125
tat atg cgt acc cgc ccc ttt gtc tta ttt aat cat tcc acc tgc cgt 554
Tyr Met Arg Thr Arg Pro Phe Val Leu Phe Asn His Ser Thr Cys Arg
      130              135              140
cct gaa gat gag aat act ttg cga aaa aat ggc tct tac cct tcc ggg 602
Pro Glu Asp Glu Asn Thr Leu Arg Lys Asn Gly Ser Tyr Pro Ser Gly
      145              150              155
cat act gct tat ggt aca ctt ctg gca tta gta tta tcc gag gcc aga 650
His Thr Ala Tyr Gly Thr Leu Leu Ala Leu Val Leu Ser Glu Ala Arg
      160              165              170
ccg gaa cgc gcg cag gag ctc gcc aga cgc gga tgg gag ttc ggg caa 698
Pro Glu Arg Ala Gln Glu Leu Ala Arg Arg Gly Trp Glu Phe Gly Gln
      175              180              185
agc aga gtg ata tgc ggt gct cac tgg caa agc gat gtt gat gct ggc 746
Ser Arg Val Ile Cys Gly Ala His Trp Gln Ser Asp Val Asp Ala Gly
190              195              200              205
cgt tat gtg gga gca gta gag ttt gca aga ctg caa aca atc ccg gct 794
Arg Tyr Val Gly Ala Val Glu Phe Ala Arg Leu Gln Thr Ile Pro Ala
      210              215              220
ttt cag aag tca ctg gca aaa tcc gtg agg agc tgaacgacaa aaataattta 847
Phe Gln Lys Ser Leu Ala Lys Ser Val Arg Ser
      225              230
ttgagtaaag aagatcaccc caaacttaat tactgaaggt gaaagtcttc ccgcaaactg 907
gccacagcaa atgaaaggaa gtgcaactgc gtaggggcgg ccgggcgtgg agaatgcctt 967
tggtttcccc gattcgcattg aatt 991

```

<210> 6

<211> 232

<212> PRT

<213> Salmonella typhimurium

<400> 6

Met Lys Ser Arg Tyr Leu Val Phe Phe Leu Pro Leu Ile Val Ala Lys

THIS PAGE BLANK (USPTO)

8/44

1	5	10	15
Tyr Thr Ser Ala Glu Thr Val Gln Pro Phe His Ser Pro Glu Glu Ser			
20	25	30	
Val Asn Ser Gln Phe Tyr Leu Pro Pro Pro Pro Gly Asn Asp Asp Pro			
35	40	45	
Ala Tyr Arg Tyr Asp Lys Glu Ala Tyr Phe Lys Gly Tyr Ala Ile Lys			
50	55	60	
Gly Ser Pro Arg Trp Lys Gln Ala Ala Glu Asp Ala Asp Val Ser Val			
65	70	75	80
Glu Asn Ile Ala Arg Ile Phe Ser Pro Val Val Gly Ala Lys Ile Asn			
85	90	95	
Pro Lys Asp Thr Pro Glu Thr Trp Asn Met Leu Lys Asn Leu Leu Thr			
100	105	110	
Met Gly Gly Tyr Tyr Ala Thr Ala Ser Ala Lys Lys Tyr Tyr Met Arg			
115	120	125	
Thr Arg Pro Phe Val Leu Phe Asn His Ser Thr Cys Arg Pro Glu Asp			
130	135	140	
Glu Asn Thr Leu Arg Lys Asn Gly Ser Tyr Pro Ser Gly His Thr Ala			
145	150	155	160
Tyr Gly Thr Leu Leu Ala Leu Val Leu Ser Glu Ala Arg Pro Glu Arg			
165	170	175	
Ala Gln Glu Leu Ala Arg Arg Gly Trp Glu Phe Gly Gln Ser Arg Val			
180	185	190	
Ile Cys Gly Ala His Trp Gln Ser Asp Val Asp Ala Gly Arg Tyr Val			
195	200	205	
Gly Ala Val Glu Phe Ala Arg Leu Gln Thr Ile Pro Ala Phe Gln Lys			
210	215	220	
Ser Leu Ala Lys Ser Val Arg Ser			
225	230		

<210> 7

<211> 1335

<212> DNA

<213> Zymomonas mobilis

<220>

<221> CDS

<222> (317)..(1108)

<400> 7

```

gtgccttata tcacgggggg atcagtctgc ggcaattggt ggcatggcac gcgctacggc 60
acgccggaag gcttcatggt cgtcaaagtc gaaaagggtta aagtcattcc gcattacgaa 120
agctatggct tccacacgat agaccgcgc aacacataat tgtcttatta tagccacatg 180

```

THIS PAGE BLANK (USPTO)

atatttttat attacaattt taaactaaaa ttaagaatta aattcttgaa ataaaggttt 240
 ttttattaaa aggataggaa atgtcgtgaa atcggcattt tctatccata ttatataaca 300
 agggaagact gacgac atg ata aaa gtc ccg cgg ttc atc tgt atg atc gcg 352

Met Ile Lys Val Pro Arg Phe Ile Cys Met Ile Ala

1 5 10
 ctt aca tcc ggc gtt ctg gca agc ggc ctt tct caa agc gtt tca gct 400
 Leu Thr Ser Gly Val Leu Ala Ser Gly Leu Ser Gln Ser Val Ser Ala

15 20 25
 cat aca gaa aaa agt gaa ccc tcc tcg act tat cat ttc cac agc gat 448
 His Thr Glu Lys Ser Glu Pro Ser Ser Thr Tyr His Phe His Ser Asp

30 35 40
 ccc ctt ctt tac ctt gcg ccc cca ccc act tcc ggc agt cca tta cag 496
 Pro Leu Leu Tyr Leu Ala Pro Pro Pro Thr Ser Gly Ser Pro Leu Gln

45 50 55 60
 gcg cat gat gat caa acc ttt aac agc acc aga caa tta aaa ggt agc 544
 Ala His Asp Asp Gln Thr Phe Asn Ser Thr Arg Gln Leu Lys Gly Ser

65 70 75
 acg cgc tgg gca ttg gca act caa gat gcc gat ctt cat ctc gct tca 592
 Thr Arg Trp Ala Leu Ala Thr Gln Asp Ala Asp Leu His Leu Ala Ser

80 85 90
 gtt ctc aaa gac tat gcc tgc gcc gca gga atg aat ctc gat att gcg 640
 Val Leu Lys Asp Tyr Ala Cys Ala Ala Gly Met Asn Leu Asp Ile Ala

95 100 105
 caa tta ccg cat ctt gcc aat ttg att aaa cgc gca ctt cgc acc gaa 688
 Gln Leu Pro His Leu Ala Asn Leu Ile Lys Arg Ala Leu Arg Thr Glu

110 115 120
 tat gac gat att ggc aga gcc aaa aat aac tgg aat cgc aaa cga cct 736
 Tyr Asp Asp Ile Gly Arg Ala Lys Asn Asn Trp Asn Arg Lys Arg Pro

125 130 135 140
 ttt gtg gat acc gat caa ccc atc tgc acg gaa aaa gat cgc gaa ggt 784
 Phe Val Asp Thr Asp Gln Pro Ile Cys Thr Glu Lys Asp Arg Glu Gly

145 150 155
 ctg gga aaa caa ggc tcc tat cct tca ggt cat acg act atc ggt tgg 832
 Leu Gly Lys Gln Gly Ser Tyr Pro Ser Gly His Thr Thr Ile Gly Trp

160 165 170
 agc gtt gcg ctc att ctg gct gaa ttg atc ccc gat cat gcg gcg aat 880
 Ser Val Ala Leu Ile Leu Ala Glu Leu Ile Pro Asp His Ala Ala Asn

175 180 185
 att ttg cag cgt ggc caa att ttt gga acc agc cgg att gtc tgc ggc 928
 Ile Leu Gln Arg Gly Gln Ile Phe Gly Thr Ser Arg Ile Val Cys Gly

190 195 200
 gcc cat tgg ttc agc gat gtg cag gca ggc tat atc atg gca tcg ggc 976
 Ala His Trp Phe Ser Asp Val Gln Ala Gly Tyr Ile Met Ala Ser Gly

THIS PAGE BLANK (USPTO)

205		210		215		220	
gaa att gca gct tta cat ggg gat gcc gat ttc cgc cga gat atg gaa	1024						
Glu Ile Ala Ala Leu His Gly Asp Ala Asp Phe Arg Arg Asp Met Glu							
		225		230		235	
tta gct cgg aaa gaa tta gaa aag gca cgc aca tca gcg cac acg cca	1072						
Leu Ala Arg Lys Glu Leu Glu Lys Ala Arg Thr Ser Ala His Thr Pro							
		240		245		250	
gac gat ctt cta tgc aag att gaa caa agc gct cgc taaattcaat	1118						
Asp Asp Leu Leu Cys Lys Ile Glu Gln Ser Ala Arg							
		255		260			
caagtattat ttcaacaagg ggaaagattg cttgctgtaa tttttggata tcaaacaggc	1178						
gaaaaaatga aagagcgca cgtctttcaa aggcaattcg atttagtcg gtggcattct	1238						
cacgccacaa accaaatcat aaataaccgc ctctttttccg ccagataact gcaaaattat	1298						
agaataccga cagctggaat atcgtaactt ttcttag	1335						

<210> 8
<211> 264
<212> PRT
<213> *Zymomonas mobilis*

<400> 8																
Met	Ile	Lys	Val	Pro	Arg	Phe	Ile	Cys	Met	Ile	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	
1				5					10					15		
Val	Leu	Ala	Ser	Gly	Leu	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ala	His	Thr	Glu	Lys	
			20					25					30			
Ser	Glu	Pro	Ser	Ser	Thr	Tyr	His	Phe	His	Ser	Asp	Pro	Leu	Leu	Tyr	
		35					40					45				
Leu	Ala	Pro	Pro	Pro	Thr	Ser	Gly	Ser	Pro	Leu	Gln	Ala	His	Asp	Asp	
	50					55					60					
Gln	Thr	Phe	Asn	Ser	Thr	Arg	Gln	Leu	Lys	Gly	Ser	Thr	Arg	Trp	Ala	
65					70					75					80	
Leu	Ala	Thr	Gln	Asp	Ala	Asp	Leu	His	Leu	Ala	Ser	Val	Leu	Lys	Asp	
				85					90					95		
Tyr	Ala	Cys	Ala	Ala	Gly	Met	Asn	Leu	Asp	Ile	Ala	Gln	Leu	Pro	His	
			100					105					110			
Leu	Ala	Asn	Leu	Ile	Lys	Arg	Ala	Leu	Arg	Thr	Glu	Tyr	Asp	Asp	Ile	
		115					120					125				
Gly	Arg	Ala	Lys	Asn	Asn	Trp	Asn	Arg	Lys	Arg	Pro	Phe	Val	Asp	Thr	
	130					135					140					
Asp	Gln	Pro	Ile	Cys	Thr	Glu	Lys	Asp	Arg	Glu	Gly	Leu	Gly	Lys	Gln	
145					150					155					160	
Gly	Ser	Tyr	Pro	Ser	Gly	His	Thr	Thr	Ile	Gly	Trp	Ser	Val	Ala	Leu	
				165					170						175	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

11/44

```

Ile Leu Ala Glu Leu Ile Pro Asp His Ala Ala Asn Ile Leu Gln Arg
      180                      185                      190
Gly Gln Ile Phe Gly Thr Ser Arg Ile Val Cys Gly Ala His Trp Phe
      195                      200                      205
Ser Asp Val Gln Ala Gly Tyr Ile Met Ala Ser Gly Glu Ile Ala Ala
      210                      215                      220
Leu His Gly Asp Ala Asp Phe Arg Arg Asp Met Glu Leu Ala Arg Lys
225                      230                      235                      240
Glu Leu Glu Lys Ala Arg Thr Ser Ala His Thr Pro Asp Asp Leu Leu
      245                      250                      255
Cys Lys Ile Glu Gln Ser Ala Arg
      260

```

<210> 9
 <211> 1650
 <212> DNA
 <213> Enterobacter aerogenes

<220>
 <221> CDS
 <222> (344)..(1087)

<220>
 <221> mat_peptide
 <222> (404)..(1087)

<220>
 <221> sig_peptide
 <222> (344)..(403)

<400> 9
 gtcgacaaac ttcgcctgct cgctatgcag aatggtttcc agcacttttag gggaaatttt 60
 acaaccgcaa cgggtccgt ggctgtattg cgtaaacga atagettgct cgctcatgga 120
 catctcctgt cattgcaatc ccgctatggt agcgcccaa cggcaagggtg ataagtgcga 180
 cagtcgaaa tcgcgagtgg ttgtcatta agcagacaaa tatgcgtttt tgcgataaccg 240
 aacaattttt tcaatgtgat ttttaactttt acttacagat gacaaaaatg tgactaaaaa 300
 caaaaccatt gttctggaca tataacaccg taaggaaatg tag atg aaa aag cgc 355
 Met Lys Lys Arg
 -20
 gtt ctc gcc ctc tgc ctc gcc agc ctg ttt tcc gtt aac gct ttc gcg 403
 Val Leu Ala Leu Cys Leu Ala Ser Leu Phe Ser Val Asn Ala Phe Ala
 -15 -10 -5 -1
 ctg gtc cct gcc ggc aat gat gca acc acc aaa ccg gat ctc tat tat 451

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Leu	Val	Pro	Ala	Gly	Asn	Asp	Ala	Thr	Thr	Lys	Pro	Asp	Leu	Tyr	Tyr	
1				5				10						15		
ctg	aaa	aat	gca	cag	gcc	atc	gat	agt	ctg	gcg	ctg	ttg	ccg	ccg	ccg	499
Leu	Lys	Asn	Ala	Gln	Ala	Ile	Asp	Ser	Leu	Ala	Leu	Leu	Pro	Pro	Pro	
			20					25					30			
ccg	gaa	gtt	ggc	agc	atc	gca	ttt	tta	aac	gat	cag	gcg	atg	tat	gag	547
Pro	Glu	Val	Gly	Ser	Ile	Ala	Phe	Leu	Asn	Asp	Gln	Ala	Met	Tyr	Glu	
		35					40					45				
aaa	gga	cgg	ctg	ttg	cgc	aat	acc	gaa	cgt	ggc	aag	cag	gcg	cag	gca	595
Lys	Gly	Arg	Leu	Leu	Arg	Asn	Thr	Glu	Arg	Gly	Lys	Gln	Ala	Gln	Ala	
	50					55					60					
gat	gct	gac	ctg	gcc	gcc	ggc	gac	gtc	gcg	aat	gcc	ttc	tcc	agc	gct	643
Asp	Ala	Asp	Leu	Ala	Ala	Gly	Asp	Val	Ala	Asn	Ala	Phe	Ser	Ser	Ala	
65					70				75						80	
ttt	ggt	tcg	ccc	atc	acc	gaa	aaa	gac	gcg	ccg	cag	tta	cat	aag	ctg	691
Phe	Gly	Ser	Pro	Ile	Thr	Glu	Lys	Asp	Ala	Pro	Gln	Leu	His	Lys	Leu	
			85					90					95			
ctg	aca	aat	atg	att	gag	gat	gcc	ggc	gat	ctg	gcc	acc	cgc	agc	gcg	739
Leu	Thr	Asn	Met	Ile	Glu	Asp	Ala	Gly	Asp	Leu	Ala	Thr	Arg	Ser	Ala	
		100					105					110				
aaa	gag	aaa	tat	atg	cgc	att	cgc	ccg	ttt	gcg	ttc	tac	ggc	gtt	tca	787
Lys	Glu	Lys	Tyr	Met	Arg	Ile	Arg	Pro	Phe	Ala	Phe	Tyr	Gly	Val	Ser	
	115					120					125					
acc	tgt	aac	act	aaa	gac	cag	gac	aag	ctg	tcg	aaa	aac	gga	tct	tac	835
Thr	Cys	Asn	Thr	Lys	Asp	Gln	Asp	Lys	Leu	Ser	Lys	Asn	Gly	Ser	Tyr	
	130					135					140					
cct	tcc	ggc	cat	acc	tct	acc	ggt	tgg	gca	acc	gcg	ctg	gta	ctg	gcg	883
Pro	Ser	Gly	His	Thr	Ser	Thr	Gly	Trp	Ala	Thr	Ala	Leu	Val	Leu	Ala	
145					150				155					160		
gag	atc	aat	ccg	cag	cgg	caa	aac	gaa	att	ctc	aaa	cgc	ggc	tat	gaa	931
Glu	Ile	Asn	Pro	Gln	Arg	Gln	Asn	Glu	Ile	Leu	Lys	Arg	Gly	Tyr	Glu	
			165				170					175				
ttg	ggc	gaa	agc	cgg	gtt	atc	tgc	ggc	tat	cat	tgg	cag	agc	gat	gtc	979
Leu	Gly	Glu	Ser	Arg	Val	Ile	Cys	Gly	Tyr	His	Trp	Gln	Ser	Asp	Val	
		180					185					190				
gat	gcg	gcg	cgg	ata	gtc	ggc	tcg	gcg	gtg	gtg	gcg	acc	ctg	cat	acc	1027
Asp	Ala	Ala	Arg	Ile	Val	Gly	Ser	Ala	Val	Val	Ala	Thr	Leu	His	Thr	
	195					200					205					
aac	ccg	gcc	ttc	caa	cag	cag	ttg	cag	aaa	gca	aag	gat	gaa	ttc	gcc	10

THIS PAGE BLANK (uspto)

225

gcgccttctc egggtacta aatcgcacag cgctgtagcc ccggttaagcg ccagcgccac 1187
 cggggatttt gagatagcca gcaccagtag tttcagccag cgtgatgaat acattaacgg 1247
 caggccgcat gagtcgtaga tactgttate ggtttgcaac ttttttaagg ttttttcccg 1307
 gaggcggcgc gctgcgcctt ctccgggcta ctaaategca cagcgtgta gccccggtaa 1367
 gcggcagcgc caccgggggt aacaagegca gattcagaag cgcgtagca acggcgcggt 1427
 atccgggcgc gtaaacaatgg ttgatgcttt taactgcggc gtgccaaggt agaggaaacc 1487
 gacaattttg tcctgttcgc ggcagccaaa gccttcgagg acaaccggac tctcggttaa 1547
 cgcaccgata cgccagatac cgttatagcc ctgcgccact gcggccattt gcacgccat 1607
 caccgcacat cccgcggaca tctcctgttc ccacagcggt acc 1650

<210> 10

<211> 248

<212> PRT

<213> *Enterobacter aerogenes*

<400> 10

Met	Lys	Lys	Arg	Val	Leu	Ala	Leu	Cys	Leu	Ala	Ser	Leu	Phe	Ser	Val	-20	-15	-10	-5
Asn	Ala	Phe	Ala	Leu	Val	Pro	Ala	Gly	Asn	Asp	Ala	Thr	Thr	Lys	Pro	-1	1	5	10
Asp	Leu	Tyr	Tyr	Leu	Lys	Asn	Ala	Gln	Ala	Ile	Asp	Ser	Leu	Ala	Leu	15	20	25	
Leu	Pro	Pro	Pro	Pro	Glu	Val	Gly	Ser	Ile	Ala	Phe	Leu	Asn	Asp	Gln	30	35	40	
Ala	Met	Tyr	Glu	Lys	Gly	Arg	Leu	Leu	Arg	Asn	Thr	Glu	Arg	Gly	Lys	45	50	55	60
Gln	Ala	Gln	Ala	Asp	Ala	Asp	Leu	Ala	Ala	Gly	Asp	Val	Ala	Asn	Ala	65	70	75	
Phe	Ser	Ser	Ala	Phe	Gly	Ser	Pro	Ile	Thr	Glu	Lys	Asp	Ala	Pro	Gln	80	85	90	
Leu	His	Lys	Leu	Leu	Thr	Asn	Met	Ile	Glu	Asp	Ala	Gly	Asp	Leu	Ala	95	100	105	
Thr	Arg	Ser	Ala	Lys	Glu	Lys	Tyr	Met	Arg	Ile	Arg	Pro	Phe	Ala	Phe	110	115	120	
Tyr	Gly	Val	Ser	Thr	Cys	Asn	Thr	Lys	Asp	Gln	Asp	Lys	Leu	Ser	Lys	125	130	135	140
Asn	Gly	Ser	Tyr	Pro	Ser	Gly	His	Thr	Ser	Thr	Gly	Trp	Ala	Thr	Ala	145	150	155	
Leu	Val	Leu	Ala	Glu	Ile	Asn	Pro	Gln	Arg	Gln	Asn	Glu	Ile	Leu	Lys	160	165	170	
Arg	Gly	Tyr	Glu	Leu	Gly	Glu	Ser	Arg	Val	Ile	Cys	Gly	Tyr	His	Trp	175	180	185	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

14/44

Gln	Ser	Asp	Val	Asp	Ala	Ala	Arg	Ile	Val	Gly	Ser	Ala	Val	Val	Ala
190							195				200				
Thr	Leu	His	Thr	Asn	Pro	Ala	Phe	Gln	Gln	Gln	Leu	Gln	Lys	Ala	Lys
205					210					215					220
Asp	Glu	Phe	Ala	Lys	Thr	Gln	Lys								
				225											

<210> 11

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 11

caaacctgag ctttggcgat gtggc

25

<210> 12

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 12

gtttggactc gaaaccgcta caccg

25

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: partial amino
acid sequence around mutation

<400> 13

Asn Leu Ser Phe Gly Asp Val

1

5

<210> 14

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 14

caaacctgag ctacggcgat gtggc

25

<210> 15

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 15

gtttggactc gatgccgcta caccg

25

<210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: partial amino
acid sequence around mutation

<400> 16

Asn Leu Ser Tyr Gly Asp Val

1

5

<210> 17

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 17

THIS PAGE BLANK (USPTO)

caaacctgag ctggggcgat gtggc

25

<210> 18

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 18

gtttggactc gaccccgcta caccg

25

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: partial amino
acid sequence around mutation

<400> 19

Asn Leu Ser Trp Gly Asp Val

1

5

<210> 20

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 20

caaacctgag cgacggcgat gtggc

25

<210> 21

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

THIS PAGE BLANK (USPTO)

17/44

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 21

gtttggactc gctgccgcta caccg

25

<210> 22

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: partial amino
acid sequence around mutation

<400> 22

Asn Leu Ser Asp Gly Asp Val

1

5

<210> 23

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 23

caaacctgag cgttggcgat gtggc

25

<210> 24

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 24

gtttggactc gcaaccgcta caccg

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

THIS PAGE BLANK (user to)

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: partial amino
acid sequence around mutation

<400> 25

Asn Leu Ser Val Gly Asp Val
1 5

<210> 26

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 26

caaacctgag cgaaggcgat gtggc

25

<210> 27

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 27

gtttggactc gcttcgcta caccg

25

<210> 28

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: partial amino
acid sequence around mutation

<400> 28

Asn Leu Ser Glu Gly Asp Val

THIS PAGE BLANK (uspro)

19/44

1

5

<210> 29

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 29

caaacctgag catgggcgat gtggc

25

<210> 30

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 30

gtttggactc gtaccgcta caccg

25

<210> 31

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: partial amino
acid sequence around mutation

<400> 31

Asn Leu Ser Met Gly Asp Val

1

5

<210> 32

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

THIS PAGE BLANK (USPTO)

20/44

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 32

caaacctgag caccggcgat gtggc

25

<210> 33

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 33

gtttggactc gtggccgcta caccg

25

<210> 34

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: partial amino
acid sequence around mutation

<400> 34

Asn Leu Ser Thr Gly Asp Val

1

5

<210> 35

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 35

caaacctgag cctgggcgat gtggc

25

<210> 36

<211> 25

<212> DNA

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 36

gtttggactc ggacccgcta caccg

25

<210> 37

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: partial amino
acid sequence around mutation

<400> 37

Asn Leu Ser Leu Gly Asp Val

1

5

<210> 38

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 38

caaacctgag ccgtggcgat gtggc

25

<210> 39

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 39

gtttggactc ggcaccgcta caccg

25

THIS PAGE BLANK (uspto)

22/44

<210> 40

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: partial amino
acid sequence around mutation

<400> 40

Asn Leu Ser Arg Gly Asp Val

1

5

<210> 41

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 41

caaacctgag ccagggcgat gtggc

25

<210> 42

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 42

gtttggactc ggtcccgcta caccg

25

<210> 43

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: partial amino
acid sequence around mutation

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<400> 43

Asn Leu Ser Gln Gly Asp Val

1

5

<210> 44

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 44

caaacctgag caaaggcgat gtggc

25

<210> 45

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 45

gtttggactc gtttccgcta caccg

25

<210> 46

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: partial amino
acid sequence around mutation

<400> 46

Asn Leu Ser Lys Gly Asp Val

1

5

<210> 47

<211> 25

<212> DNA

THIS PAGE BLANK (uspro)

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 47

caaacctgag cccgggcat gtggc

25

<210> 48

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 48

gtttggactc gggcccgcta caccg

25

<210> 49

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: partial amino
acid sequence around mutation

<400> 49

Asn Leu Ser Pro Gly Asp Val

1

5

<210> 50

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 50

caaacctgag cgcgggcat gtggc

25

THIS PAGE BLANK (USPTO)

25/44

<210> 51

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 51

gtttggactc gcgcccgccta caccg

25

<210> 52

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: partial amino
acid sequence around mutation

<400> 52

Asn Leu Ser Ala Gly Asp Val

1

5

<210> 53

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 53

caaacctgag caacggcgat gtggc

25

<210> 54

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<400> 54

gtttggactc gttgccgcta caccg

25

<210> 55

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: partial amino
acid sequence around mutation

<400> 55

Asn Leu Ser Asn Gly Asp Val

1

5

<210> 56

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 56

caaacctgag cgggtggcgat gtggc

25

<210> 57

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 57

gtttggactc gccaccgcta caccg

25

<210> 58

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

THIS PAGE BLANK (USPTO)

27/44

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: partial amino
acid sequence around mutation

<400> 58

Asn Leu Ser Gly Gly Asp Val

1

5

<210> 59

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 59

caaacctgag ccacggcgat gtggc

25

<210> 60

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 60

gtttggactc ggtgccgcta caccg

25

<210> 61

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: partial amino
acid sequence around mutation

<400> 61

Asn Leu Ser His Gly Asp Val

1

5

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<210> 62

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 62

cgaaaccgga ttgtactac ctcaa

25

<210> 63

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 63

gctttggcct aaccatgatg gagtt

25

<210> 64

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: partial amino
acid sequence around mutation

<400> 64

Lys Pro Asp Trp Tyr Tyr Leu

1

5

<210> 65

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

THIS PAGE BLANK (uspto)

<400> 65
atgcaaacct gtggagtggc gatgt 25

<210> 66
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 66
tacgtttgga cacctcacgc ctaca 25

<210> 67
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: partial amino
acid sequence around mutation

<400> 67
Ala Asn Leu Trp Ser Gly Asp
1 5

<210> 68
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 68
acctgagcag ttgggatgtg gcgaa 25

<210> 69
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

THIS PAGE BLANK (USPTO)

30/44

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 69

tggactcgtc aaccctacac cgctt

25

<210> 70

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: partial amino
acid sequence around mutation

<400> 70

Leu Ser Ser Trp Asp Val Ala

1

5

<210> 71

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 71

ccaatatgat ttttgacgcc gggga

25

<210> 72

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 72

ggttatacta aaaactgcgg ccctt

25

<210> 73

<211> 7

THIS PAGE BLANK (USPTO)

31/44

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: partial amino acid sequence around mutation

<400> 73

Asn Met Ile Phe Asp Ala Gly

1

5

<210> 74

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 74

ccaatatgat ttgggacgcc gggga

25

<210> 75

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 75

ggttatacta aaccctgcgg cccct

25

<210> 76

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: partial amino acid sequence around mutation

<400> 76

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Asn Met Ile Trp Asp Ala Gly
1 5

<210> 77

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 77

cagacctggc ctttggcgat gtggc

25

<210> 78

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 78

gtctggaccg gaaaccgcta caccg

25

<210> 79

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: partial amino
acid sequence around mutation

<400> 79

Asp Leu Ala Phe Gly Asp Val

1

5

<210> 80

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

THIS PAGE BLANK (uspto)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 80

cagacctggc cgaaggcgat gtggc_

25

<210> 81

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 81

gtctggaccg gcttcgcta caccg

25

<210> 82

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: partial amino
acid sequence around mutation

<400> 82

Asp Leu Ala Glu Gly Asp Val

1

5

<210> 83

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 83

tgaccaatat ggacgaggac gccgg

25

<210> 84

<211> 25

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 84

actggttata cctgctcctg cggcc

25

<210> 85

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: partial amino
acid sequence around mutation

<400> 85

Thr Asn Met Asp Glu Asp Ala

1

5

<210> 86

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 86

ggcatacctc taacggctgg gctac

25

<210> 87

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 87

ccgtatggag attgccgacc cgatg

25

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<210> 88

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: partial amino
acid sequence around mutation

<400> 88

His Thr Ser Asn Gly Trp Ala
1 5

<210> 89

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 89

accaggacaa attctccaaa aatgg

25

<210> 90

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 90

tggtcctggtt taagaggttt ttacc

25

<210> 91

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: partial amino

THIS PAGE BLANK (uspto)

acid sequence around mutation

<400> 91

Gln Asp Lys Phe Ser Lys Asn

1

5

<210> 92

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 92

accaggacaa aaaatccaaa aatgg

25

<210> 93

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 93

tggtcctgtt ttttaggttt ttacc

25

<210> 94

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: partial amino
acid sequence around mutation

<400> 94

Gln Asp Lys Lys Ser Lys Asn

1

5

<210> 95

<211> 25

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 95

accaggacaa agaatccaaa aatgg

25

<210> 96

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 96

tggctctgtt tcttaggttt ttacc

25

<210> 97

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: partial amino
acid sequence around mutation

<400> 97

Gln Asp Lys Glu Ser Lys Asn

1

5

<210> 98

<211> 5

<212> PRT

<213> Enterobacter aerogenes

<400> 98

Leu Val Pro Ala Gly

5

<210> 99

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 99
cttacagatg actataatgt gactaaaaac 30

<210> 100
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 100
gttttttagtc acattatag tcatctgtaag 30

<210> 101
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 101
tctaccggtt gggcatccgc gctggtactg gcg 33

<210> 102
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 102
cgccagtacc agcgcggatg cccaaccggt aga 33

THIS PAGE BLANK (USPTO)

MUT300

<210> 103

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 103

tccggccata cctcttccgg ttgggcatcc gcg

33

<210> 104

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 104

cgcggtatgcc caaccggaag aggtatggcc gga

33

<210> 105

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 105

gatgctgacc tggccgttgg cgacgtcgcg aat

33

<210> 106

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 106

THIS PAGE BLANK (USPTO)

attcgcgacg tcgccaacgg ccaggtcagc atc 33

<210> 107

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 107

ctgacaaata tgattctgga tgccggcgat ctg 33

<210> 108

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 108

cagatcgccg gcatccagaa tcatatttgt cag 33

<210> 109

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 109

gatgctgacc tggccatgg gcgacgtcgcg aat 33

<210> 110

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<400> 110
attcgcgacg tcgcccattg gccaggtcagc atc 33

<210> 111
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 111
ctgacaaata tgattcagg atgccggcgat ctg 33

<210> 112
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 112
cagatcgccg gcacacctga atcatatttgt cag 33

<210> 113
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 113
tccggccata cctctgctgg ttgggcatcc gcg 33

<210> 114
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<400> 114
cgcg gatgcc caaccagcag aggtatggcc gga 33

<210> 115
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 115
tccggccata cctctggcgg ttgggcatcc gcg 33

<210> 116
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 116
cgcg gatgcc caaccgccag aggtatggcc gga 33

<210> 117
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 117
gatgctgacc tggccgaagg cgacgtcgcg aat 33

<210> 118
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 118

atcgcgcgacg tcgccttcgg ccaggtcagc atc 33

<210> 119

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 119

gatgctgacc tggccaaagg cgacgtcgcg aat 33

<210> 120

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 120

atcgcgcgacg tcgccttttg ccaggtcagc atc 33

<210> 121

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: common motif
among acidic phosphatase family

<220>

<221> UNSURE

<222> (2,3,4,5,6,7)

<223> X=optional amino acid

<400> 121

Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Pro

THIS PAGE BLANK (USPTO)

1

5

<210> 122

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: common motif
among acidic phosphatase family

<400> 122

Pro Ser Gly His

1

<210> 123

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: common motif
among acidic phosphatase family

<220>

<221> UNSURE

<222> (3,4,5,6,7,9,10,11)

<223> X=optional amino acid

<400> 123

Ser Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His Xaa Xaa Xaa Asp

1

5

10

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05973

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N 9/12, C12N 15/54, C12N 1/21 // (C12N1/21, C12R 1:19)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N 9/12, C12N 15/54, C12N 1/21

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE, GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, 96/37603, A (Ajinomoto Co. Inc.), 28 November, 1996 (28.11.96) & EP, 832970, A & US, 6010851, A & JP, 9-637603	1-27
A	EP, 857788, A (Ajinomoto Co. Inc.), 12 August, 1998 (12.08.98) & US, 6015697, A & JP, 10-201481	1-27

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
28 November, 2000 (28.11.00)Date of mailing of the international search report
12 December, 2000 (12.12.00)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N 9/12, C12N 15/54, C12N 1/21 // (C12N1/21, C12R 1:19)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N 9/12, C12N 15/54, C12N 1/21

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE, GenBank/EMBL/DBJ/Geneseq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO, 96/37603, A (Ajinomoto Co. Inc.) 28. 11. 1996 (28. 11. 96) & EP, 832970, A & US, 6010851, A & JP, 9-637603	1-27
A	EP, 857788, A (Ajinomoto Co. Inc.) 12. 8. 1998 (12. 08. 98) & US, 6015697, A & JP, 10-201481	1-27

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

28. 11. 00

国際調査報告の発送日

12.12.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

加藤 浩

4B

9050

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

THIS PAGE BLANK (USPTO)